

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UND
IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG
DER NEURALEN ELEMENTE DER RIECHSCHLEIMHAUT
DES HUNDES UND
LICHTMIKROSKOPISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE
CHARAKTERISIERUNG SPONTANER
RIECHSCHLEIMHAUTTUMOREN BEI HUND UND KATZE

ANGELA HAFNER

1987

Disbui. München



Aus dem
Institut für Tierpathologie der Universität München
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
Vorstand Prof. Dr. E. Dahme

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG
DER NEURALEN ELEMENTE DER RIECHSCHLEIMHAUT DES HUNDES UND
LICHTMIKROSKOPISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
SPONTANER RIECHSCHLEIMHAUTTUMOREN BEI HUND UND KATZE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Angela Hafner
aus
München

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker
Referent: Prof. Dr. E. Dahme
Korreferent: Prof. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

1.1	Einleitung	1
1.2	Themenkomplex	2
2.1	Themenkomplex	3
2.2	Themenkomplex	4
2.3	Themenkomplex	5
2.4	Themenkomplex	6
2.5	Themenkomplex	7
2.6	Themenkomplex	8
2.7	Themenkomplex	9
2.8	Themenkomplex	10
2.9	Themenkomplex	11
2.10	Themenkomplex	12
2.11	Themenkomplex	13
2.12	Themenkomplex	14
2.13	Themenkomplex	15
2.14	Themenkomplex	16
2.15	Themenkomplex	17
2.16	Themenkomplex	18
2.17	Themenkomplex	19
2.18	Themenkomplex	20
2.19	Themenkomplex	21
2.20	Themenkomplex	22
2.21	Themenkomplex	23
2.22	Themenkomplex	24
2.23	Themenkomplex	25
2.24	Themenkomplex	26
2.25	Themenkomplex	27
2.26	Themenkomplex	28
2.27	Themenkomplex	29
2.28	Themenkomplex	30
2.29	Themenkomplex	31
2.30	Themenkomplex	32
2.31	Themenkomplex	33
2.32	Themenkomplex	34
2.33	Themenkomplex	35
2.34	Themenkomplex	36
2.35	Themenkomplex	37
2.36	Themenkomplex	38
2.37	Themenkomplex	39
2.38	Themenkomplex	40
2.39	Themenkomplex	41
2.40	Themenkomplex	42
2.41	Themenkomplex	43
2.42	Themenkomplex	44
2.43	Themenkomplex	45
2.44	Themenkomplex	46
2.45	Themenkomplex	47
2.46	Themenkomplex	48
2.47	Themenkomplex	49
2.48	Themenkomplex	50
2.49	Themenkomplex	51
2.50	Themenkomplex	52
2.51	Themenkomplex	53
2.52	Themenkomplex	54
2.53	Themenkomplex	55
2.54	Themenkomplex	56
2.55	Themenkomplex	57
2.56	Themenkomplex	58
2.57	Themenkomplex	59
2.58	Themenkomplex	60
2.59	Themenkomplex	61
2.60	Themenkomplex	62
2.61	Themenkomplex	63
2.62	Themenkomplex	64
2.63	Themenkomplex	65
2.64	Themenkomplex	66
2.65	Themenkomplex	67
2.66	Themenkomplex	68
2.67	Themenkomplex	69
2.68	Themenkomplex	70
2.69	Themenkomplex	71
2.70	Themenkomplex	72
2.71	Themenkomplex	73
2.72	Themenkomplex	74
2.73	Themenkomplex	75
2.74	Themenkomplex	76
2.75	Themenkomplex	77
2.76	Themenkomplex	78
2.77	Themenkomplex	79
2.78	Themenkomplex	80
2.79	Themenkomplex	81
2.80	Themenkomplex	82
2.81	Themenkomplex	83
2.82	Themenkomplex	84
2.83	Themenkomplex	85
2.84	Themenkomplex	86
2.85	Themenkomplex	87
2.86	Themenkomplex	88
2.87	Themenkomplex	89
2.88	Themenkomplex	90
2.89	Themenkomplex	91
2.90	Themenkomplex	92
2.91	Themenkomplex	93
2.92	Themenkomplex	94
2.93	Themenkomplex	95
2.94	Themenkomplex	96
2.95	Themenkomplex	97
2.96	Themenkomplex	98
2.97	Themenkomplex	99
2.98	Themenkomplex	100
2.99	Themenkomplex	101
2.100	Themenkomplex	102

Meinen Eltern

3.1	Themenkomplex	103
3.2	Themenkomplex	104
3.3	Themenkomplex	105
3.4	Themenkomplex	106
3.5	Themenkomplex	107
3.6	Themenkomplex	108
3.7	Themenkomplex	109
3.8	Themenkomplex	110
3.9	Themenkomplex	111
3.10	Themenkomplex	112
3.11	Themenkomplex	113
3.12	Themenkomplex	114
3.13	Themenkomplex	115
3.14	Themenkomplex	116
3.15	Themenkomplex	117
3.16	Themenkomplex	118
3.17	Themenkomplex	119
3.18	Themenkomplex	120
3.19	Themenkomplex	121
3.20	Themenkomplex	122
3.21	Themenkomplex	123
3.22	Themenkomplex	124
3.23	Themenkomplex	125
3.24	Themenkomplex	126
3.25	Themenkomplex	127
3.26	Themenkomplex	128
3.27	Themenkomplex	129
3.28	Themenkomplex	130
3.29	Themenkomplex	131
3.30	Themenkomplex	132
3.31	Themenkomplex	133
3.32	Themenkomplex	134
3.33	Themenkomplex	135
3.34	Themenkomplex	136
3.35	Themenkomplex	137
3.36	Themenkomplex	138
3.37	Themenkomplex	139
3.38	Themenkomplex	140
3.39	Themenkomplex	141
3.40	Themenkomplex	142
3.41	Themenkomplex	143
3.42	Themenkomplex	144
3.43	Themenkomplex	145
3.44	Themenkomplex	146
3.45	Themenkomplex	147
3.46	Themenkomplex	148
3.47	Themenkomplex	149
3.48	Themenkomplex	150
3.49	Themenkomplex	151
3.50	Themenkomplex	152
3.51	Themenkomplex	153
3.52	Themenkomplex	154
3.53	Themenkomplex	155
3.54	Themenkomplex	156
3.55	Themenkomplex	157
3.56	Themenkomplex	158
3.57	Themenkomplex	159
3.58	Themenkomplex	160
3.59	Themenkomplex	161
3.60	Themenkomplex	162
3.61	Themenkomplex	163
3.62	Themenkomplex	164
3.63	Themenkomplex	165
3.64	Themenkomplex	166
3.65	Themenkomplex	167
3.66	Themenkomplex	168
3.67	Themenkomplex	169
3.68	Themenkomplex	170
3.69	Themenkomplex	171
3.70	Themenkomplex	172
3.71	Themenkomplex	173
3.72	Themenkomplex	174
3.73	Themenkomplex	175
3.74	Themenkomplex	176
3.75	Themenkomplex	177
3.76	Themenkomplex	178
3.77	Themenkomplex	179
3.78	Themenkomplex	180
3.79	Themenkomplex	181
3.80	Themenkomplex	182
3.81	Themenkomplex	183
3.82	Themenkomplex	184
3.83	Themenkomplex	185
3.84	Themenkomplex	186
3.85	Themenkomplex	187
3.86	Themenkomplex	188
3.87	Themenkomplex	189
3.88	Themenkomplex	190
3.89	Themenkomplex	191
3.90	Themenkomplex	192
3.91	Themenkomplex	193
3.92	Themenkomplex	194
3.93	Themenkomplex	195
3.94	Themenkomplex	196
3.95	Themenkomplex	197
3.96	Themenkomplex	198
3.97	Themenkomplex	199
3.98	Themenkomplex	200
3.99	Themenkomplex	201
3.100	Themenkomplex	202

Inhaltsübersicht

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturüberblick	2
2.1. Lichtmikroskopische Morphologie der Riechschleimhaut	2
2.2. Elektronenmikroskopische Struktur	3
2.2.1. Rezeptorzelle	3
2.2.1.1. Olfaktorischer Vesikel (Sinneskolben)	3
2.2.1.2. Dendrit	7
2.2.1.3. Perikaryon	8
2.2.1.4. Axon	8
2.2.1.5. Topographische Beziehungen zwischen den zellulären Elementen der Riechschleimhaut	10
2.2.1.5.1. Anordnung der Riechzellperikarya	10
2.2.1.5.2. Zellkontakte und -verbindungen	10
2.2.2. Hüllzellen der Axone	12
2.3. Verbindung mit dem ZNS	13
2.4. Degeneration und Regeneration der olfaktorischen Rezeptorzellen	14
2.4.1. Physiologischer Turnover	14
2.4.1.1. Morphologische Hinweise	15
2.4.1.2. Lebensdauer der olfaktorischen Sinneszelle	17
2.4.1.3. Biochemische Veränderungen	18
2.4.1.4. Funktionsfähigkeit neugebildeter Riechzellen	18
2.4.2. Morphologische Veränderungen	20
2.4.2.1. Differenzierungsprozeß	20
2.4.2.1.1. Basalzellen	20
2.4.2.1.2. Olfaktorische Neuronen	21
2.4.2.2. Degeneration der Sinneszellen	21
2.4.2.3. Beseitigung der Zellfragmente	22

2.4.3.	Experimentelle Degeneration der	
	Riechzellen	23
2.4.3.1.	Chemische Irritation	23
2.4.3.2.	Axotomie	24
2.4.3.3.	Bulbektomie	25
2.5.	Immunhistochemie	26
2.5.1.	Prinzip der Immunhistochemie	26
2.5.2.	Antigene in Zellen der normalen	
	Riechschleimhaut	26
2.5.2.1.	OMP (=olfactory marker protein)	26
2.5.2.2.	NSE (=neuron-specific enolase)	28
2.5.2.3.	NFP (=neurofilament protein)	30
2.5.2.4.	S 100 (=S 100-protein)	31
2.5.2.5.	GFAP (=glial fibrillary acidic protein)	32
2.6.	Riechschleimhauttumoren	33
2.6.1.	Morphologie	34
2.6.2.	Immunhistochemie	35
3.	Eigene Untersuchungen	37
3.1.	Material und Methoden	37
3.1.1.	Untersuchungsmaterial	37
3.1.2.	Elektronenmikroskopie	38
3.1.3.	Immunhistochemie der Paraffinschnitte	38
3.1.4.	Immunhistochemie der Semidünnschnitte	40
3.2.	Die normale Riechschleimhaut des Hundes	41
3.2.1.	Elektronenmikroskopie der normalen	
	Riechschleimhaut	41
3.2.1.1.	Basalzellen	42
3.2.1.2.	Olfaktorische Sinneszelle	44
3.2.1.2.1.	Olfaktorischer Vesikel	44
3.2.1.2.2.	Peripherer Neurit und Perikaryon	47
3.2.1.2.3.	Zentraler Neurit der Rezeptorzelle (=Axon)	47
3.2.1.2.4.	Axonsonderformen	49

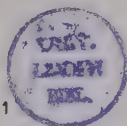
3.2.1.3.	Hüllzelle der Fila olfactoria	57
3.2.1.3.1.	Innenstruktur der Hüllzelle	57
3.2.1.3.2.	Zellverbindungen innerhalb einer Hüllzeleinheit	59
3.2.1.4.	Nervenbündel der olfaktorischen Schleimhaut	60
3.2.1.4.1.	Innerer Aufbau olfaktorischer Nervenbündel	62
3.2.1.4.2.	Peri- und Epineurium	64
3.2.1.4.3.	Nervenbündeltypen	70
3.2.2.	Immunhistochemie der normalen Riechschleimhaut	76
3.2.2.1.	NSE (=neuron-specific enolase)	76
3.2.2.2.	GFAP (=glial fibrillary acidic protein)	76
3.2.2.3.	S 100 (=S 100-protein)	77
3.2.3.	Diskussion zu Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie der normalen Riechschleimhaut	79
3.3.	Spontantumoren der Riechschleimhaut bei Hund und Katze	85
3.3.1.	Anamnesen und makroskopische Befunde	85
3.3.2.	Neurohistologische Befunde	88
3.3.3.	Immunhistochemische Ergebnisse	94
3.3.4.	Diskussion zu Tumoren der Riechschleimhaut bei Hund und Katze	97
4.	Zusammenfassung	102
5.	Summary	104
6.	Literaturverzeichnis	106

1. Einleitung

Als Makrosmatiker ist der Hund in den meisten Lebensbereichen auf seine "gute Nase", d.h. das Funktionieren seiner olfaktorischen Rezeptorzellen und der nachgeschalteten Neuronen, angewiesen. Es muß also eine jederzeit intakte Riechbahn gewährleistet sein. Da aber die Riechzellen als einzige Nervenzellen des Organismus eine eng begrenzte Lebensdauer besitzen, müssen sie kontinuierlich durch neue Sinneszellen ersetzt werden. Dieses erste olfaktorische Neuron stellt gemeinsam mit seinen Hüllen eine unmittelbare Verbindung zwischen Außenwelt (d.h. Nasenhöhle) und ZNS dar.

Tumoren im Bereich der Riechschleimhaut, Ästhesioneuroblastome und -epitheliome, sind wegen der Besonderheiten des Ursprungsgewebes, wegen ihrer nicht eindeutig geklärten Histogenese und auch wegen der Schwierigkeiten der klinischen und pathologischen Diagnosestellung von Interesse, obwohl sie vergleichsweise sehr selten vorkommen. Die durchweg malignen Tumoren neigen aufgrund ihrer Lage zum Einbruch ins ZNS, wobei bis zu diesem Zeitpunkt häufig keine erkennbaren Krankheitssymptome auftreten. Betroffen sind fast ausschließlich ältere Menschen und Tiere, d.h. in der Tiermedizin wurden Riechschleimhauttumoren bislang nur bei Hund, Katze und Pferd gesehen.

Eine weitgehend vollständige Darstellung der elektronenmikroskopischen Struktur und der Verteilung neuraler Antigene ist als Grundlage für die Charakterisierung der Tumoren der olfaktorischen Schleimhaut von großer Bedeutung. Weitergehende, über die lichtmikroskopische Beurteilung hinausführende Untersuchungen, beispielsweise der immunhistochemische Nachweis bestimmter Antigene, wären daher für die Diagnostik wünschenswert und könnten möglicherweise einen Beitrag zur Klärung der Histogenese leisten.



2. Literaturüberblick

2.1. Lichtmikroskopische Morphologie der Riechschleimhaut

Die olfaktorische Schleimhaut in den einzelnen bisher untersuchten Wirbeltierklassen und -species einschließlich des Menschen zeigt keine grundlegenden morphologischen Unterschiede. Die Bestandteile sind Epithel, Basalmembran und Lamina propria mucosae, welche dem Knochen- oder Knorpelgewebe unmittelbar aufliegt. Eine Submukosa fehlt der Riechschleimhaut (41,104).

Das Epithel, aufgrund der intraepithelial liegenden Rezeptorzellen als Neuroepithel bezeichnet, ist ein mehrreihiges Säulenepithel mit drei verschiedenen Grundzelltypen, den Riech-, Basal- und Stützzellen. Lichtmikroskopisch zu unterscheiden sind drei Zellkernlagen, die oberflächlich, z.T. in einer Reihe gelegenen Stützzellnuclei, die Rezeptorzellkerne in mehreren Reihen und die Basalzellkerne als tiefste Lage (39,41).

Die Dicke des olfaktorischen Epithels zeigt eine große Variationsbreite, sowohl innerhalb eines Individuums (4,74), als auch bei unterschiedlichen Species, übertrifft jedoch in jedem Fall die des respiratorischen Epithels (41). Für den Menschen wird eine Dicke von 60 - 70 μm (64), für das Rind ein Mittelwert von 99 μm (89) angegeben.

Cilien der Riechzellen und Microvilli der Stützzellen sind eingebettet in eine 10 - 40 μm dicke Schleimschicht, die die Epitheloberfläche bedeckt (39,41).

Im lockeren Bindegewebe der Lamina propria lassen sich Nervenzellen, die Bowmanschen Drüsen und Blutgefäße erkennen (39,41). Die Drüsenausführungsgänge erreichen durchs Epithel das Cavum nasale.

2.2. Elektronenmikroskopische Struktur

2.2.1. Rezeptorzelle

Die olfaktorische Sinneszelle stellt eine bipolare Nervenzelle dar: Ein einziger, unverzweigter, peripherer Fortsatz geht als modifizierter Dendrit vom intraepithelial gelegenen Perikaryon aus und erreicht die Epitheloberfläche. Der zentripetale Ausläufer, das Axon, zieht, ohne Kollateralen zu bilden, durch die Lamina propria des Epithels in die Schädelhöhle. Außenwelt (=Nasenhöhle) und Zentralnervensystem (=Bulbus olfactorius) stehen somit über eine Zelle in direkter Verbindung (39,41,104).

2.2.1.1. Olfaktorischer Vesikel (Sinneskolben)

Als Ort der Reizaufnahme wurde mittels verschiedener neurophysiologischer Methoden der distale Fortsatz der Rezeptorzellen identifiziert (34,35,36).

Dieser Dendrit endet in einer Zellauftreibung, dem olfaktorischen Vesikel (143) oder Sinneskolben (4), welcher bei reifen Riechzellen meist über die Epitheloberfläche vorspringt. Beim Hund wurde eine durchschnittliche Dichte der Sinneskolben von 8,3 Millionen/cm² ermittelt (87).

Die innerhalb eines Individuums unterschiedlich geformten olfaktorischen Vesikel sollen aktiv beweglich sein ("olfactor motor reaction") (41). Ein Netzwerk aus Aktinfilamenten (Durchmesser 6 nm) konnte beim Frosch nachgewiesen werden. Damit ist die Möglichkeit zur Exposition unterschiedlich großer Bereiche der Rezeptorzelloberfläche gegeben, was bei der Geruchswahrnehmung von Bedeutung sein könnte (15).

Als Organellen treten ungeordnete Neurotubuli mit einem Durchmesser von 20 nm, welche sich im Dendritenschaft in Längsrichtung orientieren, wenige Mitochondrien und kaum

glattes Endoplasmatisches Retikulum auf (41). Vesikel wurden als Ausdruck für die Fähigkeit der Zelle zur Pinozytose gewertet (25).

Das distale Rezeptorzellende trägt eine von Species zu Species sowie innerhalb eines Tieres variierende Anzahl von Cilien, gewöhnlich 10 - 15 Cilien pro Riechzelle (41). Für den Hund bestehen in der Literatur auch Angaben von 100 - 150 Cilien pro Zelle (111).

Ebenso zeigt die Cilienlänge große Variationsbreite: Bestimmt wurden Werte von ca. 12 μm bei Enten (42), ca. 80 μm bei Katzen (5), über 100 μm bei Fröschen und Hunden (116). Zusätzlich scheinen Dichte und Länge des Cilienbesatzes in verschiedenen Regionen der Riechschleimhaut Unterschiede zu zeigen, ähnlich der Epithelhöhe und der Anzahl der Sinneszellen (5).

Den Ursprung der Sinnesgeißeln bilden direkt unter der Plasmamembran lokalisierte Basalkörperchen mit dem typischen Aufbau aus neun Tubulustriplets (41). Auch freie Centriolen (ohne Cilien) sind nicht ungewöhnlich (15).

Bei den meisten Tierarten sind Basalfüßchen nachweisbar, lassen jedoch nicht die symmetrische Anordnung wie an Kinetosomen erkennen (41). Beim Hund sind ein Teil der Basalkörperchen mit neun Füßchen von ca. 130 nm Länge ausgestattet, die radiär im rechten Winkel vom Basalkörperchen ausgehen (111). In olfaktorischen Vesikeln von Fröschen ist elektronendichtes Material assoziiert mit der Basis der Centriolen und Basalkörperchen. Zusätzlich besitzen die Basalkörperchen einzelne seitliche Füßchen. Der Ursprung der längsorientierten Mikrotubuli des Dendriten scheint im Bereich dieses elektronendichten Materials besonders der lateralen Füßchen zu liegen (15).

Weiterhin werden beim Frosch Verbindungen zwischen dem distalen Ende der Basalkörperchen und der Plasmamembran beschrieben: Auf Querschnitten durch Basalkörperchen gehen diese Balken im 45°-Winkel von den Tubulustriplets aus (15).

Wurzelfüßchen sind ebenfalls inkonstant zu beobachten. In Fortsetzung der Cilien ziehen, beim Hund 1,5 - 1,8 μm lange, quergestreifte Bündel ins Innere des olfaktorischen Vesikels. Diese Wurzelfüßchen haben beim Hund eine Breite von 80 - 140 nm und bestehen aus feinen Filamenten mit einem Durchmesser von 20 nm (111). Bei Vögeln und Reptilien sind sie wesentlich länger: Sie reichen weit in den Schaft des Dendriten, z.T. sogar bis zum Zellkern (41). Neu auswachsende Sinnesgeißeln scheinen keine Wurzelfüßchen zu besitzen (5).

Die Cilien besitzen eine deutlich eingeschnürte basale Portion von ca. 0,3 - 0,4 μm Länge (15).

Der sich anschließende, ca. 1 - 1,5 μm lange Cilienschaft läßt bei den meisten Wirbeltieren den charakteristischen Aufbau einer Kinocilie mit zwei einzelnen zentralen Tubuli, die von neun Tubuluspaaren umgeben werden, erkennen, welche die Fortsetzung der Tubulustriplets des Basalkörperchens darstellen (4,31,39,41,70,104,129). Jeder zentrale Mikrotubulus besteht aus 13 Untereinheiten. Die peripheren Tubuluspaare setzen sich aus den Einheiten A mit 13 Untereinheiten und B mit 11 Untereinheiten zusammen (70).

Die proximalen Abschnitte von Froschcilien zeigen alle für Kinocilien typischen, zusätzlichen, morphologischen Charakteristika: Von den Tubuluspaaren ausgehende innere und äußere Arme, von den zentralen Tubuli ausstrahlende radiäre Fortsätze, Verbindungen zwischen den Tubuluspaaren und zwischen den zentralen Tubuli sowie eine zentrale, die beiden inneren Tubuli umhüllende Scheide (70). Den Cilien von Ratten fehlen alle diese Merkmale (70,90).

Die den Mikrotubuli anhaftenden Fortsätze sind verantwortlich für die Motilität von Kinocilien. Diese Arme bestehen aus dem Mg^{2+} -ATPase-aktiven Protein Dynein (104). Aufgrund des Fehlens derartiger Fortsätze sind die olfaktorischen Cilien von Menschen (64,104), Ratten (70,90), Katzen (5) und wahrscheinlich aller Säugetiere nicht aktiv beweglich (70,89). Im Gegensatz dazu sind bei Amphibien, Reptilien und Vögeln die Sinnesgeißeln motil; ihnen fehlt jedoch die synchrone, wellenförmige Bewegung der Kinocilien (13,75,116).

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben weiterhin die Existenz unterschiedlicher Cilien beim Frosch, in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Rezeptorzellen: Cilien unreifer, sich differenzierender Neuronen sind kürzer und aktiv beweglich im Gegensatz zu den langen, unbeweglichen Cilien reifer Nervenzellen (75).

Die trilamellären Membranen der olfaktorischen Geißeln sind auffällig dicker und färben sich intensiver als jene der respiratorischen Cilien (70). Diese Zellmembranen besitzen intramembranöse Partikel in einer drei- bis viermal höheren Konzentration als jene respiratorischer Geißeln. Möglicherweise stellen sie die morphologischen Äquivalente der Geruchsrezeptoren dar (90).

Beim Frosch ist die Plasmamembran über elektronendichtes Material mit den Mikrotubuluspaaren der Cilien verbunden, am ausgeprägtesten im kurzen, basalen Abschnitt. Somit steht die Cilienmembran über die Tubuli der Cilie, die Basalkörperchen, deren Füßchen und die Tubuli des Dendriten in direkter Verbindung mit dem Perikaryon (15). Eventuell wird olfaktorische, über die Sinnesgeißeln registrierte Information über diesen strukturellen Weg zum Perikaryon weitergeleitet, was schließlich zur Auslösung eines Aktionspotentials führen könnte (15).

Die Sinnesgeißel verjüngt sich von einem proximalen Durchmesser von ca. $0,25\ \mu\text{m}$ auf $0,06 - 0,13\ \mu\text{m}$ im Durchmesser (5,70,104). Diese "Endspieße" (4) enthalten bei Säugern i.d.R. nur mehr zwei einzelne Tubuli (4,5,31,70,104). Bei Fröschen finden sich im distalen Segment meist neun einzelne (A-Einheiten) und zwei zentrale Tubuli (15,70).

Spezielle Endstrukturen sind für Kinocilien beschrieben. Olfaktorische Cilien von Ratten zeigen ebenfalls derartige Strukturen: Die beiden Mikrotubuli sind an ihrem distalen Ende über elektronendichtes Material verbunden; distal davon ist die Cilienmatrix deutlich dichter (70).

Die dünnen "Endspieße" der Cilien orientieren sich mehr oder weniger parallel zueinander und zur Epitheloberfläche. Unter dem dichten Netzwerk aus Microvilli der Stützzellen und Cilien der Riechzellen sind die olfaktorischen Vesikel völlig verborgen (85).

Zwischen Sinneskolben und Dendritenschaft liegt eine verengte Zone, deren Plasmamembran Verbindungskomplexe mit benachbarten Zellen bildet.

2.2.1.2. Dendrit

Die Länge des Dendriten mit einem Durchmesser von $1 - 3\ \mu\text{m}$ ist abhängig von der Lage des Perikaryons innerhalb des Epithels und der Epithelhöhe (41).

Neurotubuli mit einem Durchmesser von $20\ \text{nm}$ wie im olfaktorischen Vesikel und Mitochondrien sind parallel zur Längsachse des Dendriten angeordnet (31,41,104). Die Mitochondrien besitzen longitudinal orientierte Cristae (31,64,104), im Gegensatz zu quer verlaufenden Leisten in den Mitochondrien des olfaktorischen Vesikels (31). Neurofilamente wurden in Dendriten des Salamanders beobachtet (129). Gelegentlich treten multivesikuläre Körper auf (5,111,129).

2.2.1.3. Perikaryon

Die Somata der Riechzellen (Durchmesser 5 - 8 μm) liegen im mittleren Epitheldrittel.

Der 4 - 6 μm große, runde Nucleus der olfaktorischen Sinneszelle enthält hauptsächlich Euchromatin, neben ein bis zwei deutlichen Nucleoli (41).

Mit Ausnahme des apikalen Nucleuspoles wird der Kern nur von einem 1 - 2 μm dünnen Zytoplasmasaum umgeben (39). Das überwiegend im supranukleären Bereich gelegene Zytoplasma beinhaltet Organellen, welche auf intensive Synthese von Makromolekülen hinweisen: Ausgeprägtes Endoplasmatisches Retikulum in lamellärer Ordnung (ähnlich den Nissl-Schollen) und ein gut entwickelter Golgi-Apparat füllen den Intrazellularraum weitgehend aus (39,41,104). Daneben lassen sich multivesikuläre Körper (4,104) und membranbegrenzte elektrodicht Vesikel mit lamellären Strukturen im Inneren (4,31,104) erkennen. Longitudinal verlaufende Mikrofilamente sind v.a. in Zentrum und Peripherie des Zellkörpers lokalisiert (104). Nur spärlich finden sich glattes Endoplasmatisches Retikulum, freie, rosettenförmig angeordnete Ribosomen und Mitochondrien (39).

2.2.1.4. Axon

Am proximalen Pol des Perikaryons entspringt das olfaktorische Axon, das im gesamten Verlauf keine Kollateralen abspaltet, und erreicht nach einigen um einen Durchmesser von ca. 0,2 μm (auch bis 0,8 μm) (39,41).

Bereits intraepithelial bilden die Axone kleine Bündel, die bis zum Durchtritt durch die Basalmembran in Einbuchtungen benachbarter Stütz- und Basalzellen verlaufen (41).

Olfaktorische Nervenfasern besitzen keine Myelinscheiden, sondern werden in der Lamina propria von speziellen Hüllzellen umgeben. Eine einzige dieser Zellen umhüllt Hunderte von Axonen in einer im übrigen Nervensystem unüblichen Weise: Die Axone sind nicht einzeln sondern zu Bündeln zusammengefaßt in die Hüllzellen eingebettet. Innerhalb dieser Bündel stehen die Nervenfasern in direktem Kontakt zueinander (41,104).

Der Umfang der Bündel nimmt nach proximal zu, bis z.T. mehrere hundert Nervenfasern in einer Hüllzelltasche verlaufen (39). Auch der Axonquerschnitt wird größer, wenn sich die Axone dem Bulbus olfactorius nähern, während die Elektrodendichte des Axoplasmas abnimmt (14).

Häufig lassen sich Axonanschwellungen erkennen, bedingt durch die Präsenz großer, ovaler Mitochondrien (41).

Mikrotubuli in unterschiedlicher Zahl, zwischen ein und 13, seltener auch bis 20 (4), liegen in den Nervenfasern. Diese Tubuli mit einem Durchmesser von ca. 25 nm setzen sich aus 13 Protofilamenten zusammen. Schätzungen ergaben eine Länge von mindestens 100 - 200 µm beim Frosch (14).

Die i.d.A. zwei bis drei Tubuli bei Fröschen zeigen zum Großteil zentrale Verdichtungen. Das luminale Material mit einem auf Axonquerschnitten annähernd runden Querschnitt scheint aus Granula mit einem Durchmesser von 4 - 5 nm zu bestehen, welche eine diskontinuierliche Säule bilden. Die Partikel scheinen keine Verbindung zur Tubuluswand zu besitzen und treten im bulbunahen Teil deutlich häufiger (in ca. 80% aller Tubuli) auf. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Material um Moleküle, die im Tubuluslumen in Richtung Bulbus transportiert werden (14).

2.2.1.5. Topographische Beziehungen zwischen den zellulären Elementen der Riechschleimhaut

2.2.1.5.1. Anordnung der Riechzellperikarya

Die stark variierende Epitheldicke ist in erster Linie auf Unterschiede in der Neuronendichte, d.h. der Anzahl der Sinneszellen pro Flächeneinheit, zurückzuführen (38,74).

Die Somata der reifen olfaktorischen Zellen sind in senkrecht zur Epitheloberfläche orientierten Säulen angeordnet: Einige dieser Säulen aus jeweils zwei bis acht über- und nebeneinander liegenden Riechzellen bilden zusammen mit einer basal lokalisierten Gruppe von Stammzellen und den entsprechenden Stützzellen eine "columnar unit" (49). Die Dendriten umgeben dabei ringförmig die Stützzellen (38).

Daneben unterscheiden GRAZIADEI und MONTI-GRAZIADEI (47,49) "quiescent zones" und "active zones": In den teilungsaktiven Bereichen ist die säulenförmige Anordnung nur undeutlich; es überwiegen unreife Entwicklungsstadien. In den ruhigen Zonen setzen sich dagegen die Zellsäulen v.a. aus reifen Rezeptorzellen zusammen, unreife Elemente finden sich nur spärlich. Die Verteilung der Bereiche folgt keinem regelmäßigen Muster.

2.2.1.5.2. Zellkontakte und -verbindungen

Spezifische Kontakte zwischen zwei benachbarten Riechepithelzellen treten am Übergang des olfaktorischen Vesikels in den Dendritenschaft auf. Ausgeprägte Zellverbindungskomplexe bestehen in dieser Höhe zwischen Stützzellen, zwischen Stütz- und Rezeptorzellen und seltener zwischen Rezeptorzellen. Von distal nach proximal sind sie als Zonula occludens, Zonula adhaerens und Desmosomen strukturiert (38). Als peripherer Abschluß des epithelialen Interzellularraumes ist der Zwischenzellspalt gürtelförmig um jede Zelle obliteriert (=Zonula occludens oder tight junction) (5,41,129).

Gap junctions (=offener Kontakt oder Nexus) zwischen Stützzellen werden für Ratte (88,93) und Maus (93) beschrieben.

Im Bereich des Dendritenschaftes können olfaktorische Sinneszellen ebenfalls in unmittelbarem Kontakt miteinander stehen (104). Zu beobachten sind ausgedehnte, unspezialisierte Kontakte, wobei der übliche Interzellularspalt von 15-20 nm bestehen bleibt, sowie laterale, dendritische Fortsätze, an deren Berührungsstellen sich der Interzellularspalt auf 10 nm verengt (12,38).

Desmosomale Verbindungen werden zwischen Dendriten (38) oder von anderen Autoren ausschließlich zwischen Stützzellmembranen (93) beschrieben.

BREIPOHL et al. (12) fanden bei Mäusen und Fischen neben interzellulär lokalisierten Dendriten solche, die teilweise in das supranukleäre Zytoplasma einer einzigen Stützzelle eingeschlossen sind. Auch mehrere Dendriten eingehüllt von einer Stützzelle und spiralförmig um einen Nervenfortsatz gewickeltes Zytoplasma kommen vor.

Im Bereich der Perikarya berührt der weitaus größte Teil der olfaktorischen Neuronen andere Riechzellen. Spezialisierte Zellverbindungen lassen sich dort jedoch nicht erkennen (38).

Die Axone stehen in ihrem gesamten Verlauf miteinander in engem Kontakt.

Somit kann das olfaktorische Neuron nicht als anatomisch unabhängige Einheit angesehen werden. Die funktionelle Bedeutung dieser Tatsache ist jedoch ungeklärt (38).

2.2.2. Hüllzellen der Axone

Spezielle Zellen umhüllen die Axone der Riechzellen in ihrer ganzen Ausdehnung vom Durchtritt durch die Basalmembran bis in die glomeruläre Schicht des Bulbus olfactorius. Entlang den Nervenfaserbündeln bilden sie eine ununterbrochene Kette mit ineinandergreifenden Fortsätzen benachbarter Hüllzellen (115).

Ursprünglich wurden diese Hüllzellen für typische Schwannzellen gehalten (4,33,38,39,41,108). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch auffällige Unterschiede zwischen den Hüllzellen olfaktorischer Nervenfasern und jenen myelinscheidenfreier, peripherer Nerven.

Deutlichstes Unterscheidungsmerkmal stellt die Art der Einbettung des Axons dar. So umschließen Remakzellen als polyaxonale Hüllzellen vegetativer Nerven jeweils eine relativ kleine Zahl von Axonen, dabei jedes einzeln in einer Einbuchtung liegend, während olfaktorische Nervenfasern bündelweise von ihrer Hüllzelle umgriffen werden (6,115). Die Hüllzellfortsätze bilden ein longitudinales Netzwerk von Höhlen, durch die die Axonbündel verlaufen (115).

Geringe Elektronendichte des Zytoplasmas, Auftreten von Filamenten und Glykogengranula und ein feingranulierter Nucleus ohne deutlichem Heterochromatin charakterisieren weiterhin die Hüllzelle der Riechnervenaxone (6).

An Basalmembranen von Blutgefäßen enden olfaktorische Hüllzellen in "end feet" (6).

Die morphologischen Besonderheiten der olfaktorischen Hüllzellen erinnern an Astrozyten des ZNS (6,115). Zusätzlich konnte immunhistochemisch in diesen Hüllzellen ein zytoplasmatisches Protein, welches ähnlich oder sogar identisch dem GFAP (=glial fibrillary acidic protein, siehe 2.5.2.5.)

ist, identifiziert werden. Aufgrund dieser Resultate bezeichnen BARBER und LINDSAY (6) diese Hüllzelle als Mitglied der "astrocyte family".

Olfaktorische Nervenbündel werden umgeben von einem Perineurium, einer kontinuierlichen Hülle aus flachen Zellen. Gelegentlich lassen sich Kollagenfasern und Fibroblasten innerhalb des Perineuriums nachweisen (41).

2.3. Verbindung mit dem ZNS

Die Axone der primären Riechneuronen mit ihren Perikarya im olfaktorischen Epithel bilden gebündelt die Fila olfactoria des Nervus olfactorius. Sie treten durch die Lamina cribrosa des Ethmoids in die Schädelhöhle und den Bulbus olfactorius, einen Teil des Telencephalons, ein.

Die zellulären Elemente des Bulbus sind in Schichten angeordnet. Von der Peripherie zentralwärts werden die Schicht der Fila olfactoria, die Schicht der Glomerula, die äußere plexiforme Schicht mit den periglomerulären Zellen, die Schicht der Mitralzellen und die innere plexiforme Schicht mit den granulären Zellen unterschieden (48,97,109).

Die olfaktorischen Nervenfasern enden in den lichtmikroskopisch deutlichen Glomerula, wo sie Synapsen mit den Dendriten der Mitralzellen, den sekundären Neuronen der Riechbahn, bilden. In den Glomerula unterscheiden sich die afferenten Axone von den Dendriten durch ihre elektronendichte Matrix und ihren geringeren Durchmesser. Zahlreiche Vesikel lassen sich in den Axonterminalen erkennen (45,50).

Interneuronen, die periglomerulären und die granulären Zellen, bilden lokale Querverbindungen im Bereich der Glomerula und der Mitralzellerikarya aus (48). Es existieren auch Synapsen zwischen Riechzellaxonen und Dendriten von peri-

glomerulären Zellen (97).

Die Axone der Mitralzellen verlassen als Tractus olfactorius den Bulbus (97). Diese Nervenfasern erfahren teilweise eine Umschaltung, teilweise ziehen sie unmittelbar zu corticalen Projektionsgebieten. Im Gegensatz zu allen anderen Sinnes-systemen werden Geruchsempfindungen dem Endhirn nicht über den Thalamus, sondern direkt zugeführt (109).

Die Leitungsbahnen der Geruchseindrücke zeigen beträchtliche Konvergenz: 50 Millionen Riechzellen in jeder Nasenhöhle des Kaninchens übertragen ihre Information in 1 900 Glomerula auf nur 45 000 Mitralzellen (1,48,97).

Zahlreiche Untersucher beschäftigen sich mit den topographischen Beziehungen zwischen Sinneszellperikaryon und Axon-terminal. Es konnte beim Salamander demonstriert werden, daß die Projektion von intraepithelialen Rezeptorzellen eines bestimmten Schleimhautareals auf den Bulbus olfactorius nicht auf einen engbegrenzten ZNS-Bereich erfolgt, sondern olfaktorische Sinneszellen ihre Axonendigungen zu einer großen Zahl teils weit voneinander entfernter bulbärer Glomerula senden (67).

2.4. Degeneration und Regeneration der olfaktorischen Rezeptorzellen

2.4.1. Physiologischer Turnover

Neuronen sind i.d.R. postmitotische Zellen, d.h. sie sind nach Abschluß der Ontogenese nicht mehr teilungsfähig; zugrundegegangene Nervenzellen werden nicht ersetzt und Faserdurchtrennungen haben im peripheren Nervensystem nach Wallerscher Degeneration lediglich die regenerationsfähige Sprossung des Axons zur Folge, vorausgesetzt das Perikaryon ist intakt.

Demgegenüber nehmen die olfaktorischen Sinneszellen, wie auch die Rezeptoren des Vomeronasalorgans (7,8), im Nervensystem insofern eine Sonderstellung ein, als sie als intermitotische Zellen lebenslang einem kontinuierlichen, physiologischen Turnover unterliegen: Dem physiologischen Verschleiß der gesamten Riechzelle folgt der Ersatz durch Proliferation von Stammzellen und Differenzierung zu reifen, funktionstüchtigen Sinneszellen.

Um den Unterschied dieses Vorganges zur Regeneration eines Axons ohne vorausgegangene Degeneration der ganzen Zelle zu verdeutlichen, schlagen MONTI-GRAZIADEI und GRAZIADEI (96) den Begriff "Rekonstitution" für den Ersatz der Riechzellen vor.

2.4.1.1. Morphologische Hinweise

NAKAHARA (108) beschrieb 1940 die völlige morphologische Wiederherstellung der Riechschleimhaut nach Degeneration der Nervenzellen. Er unterscheidet zwei Typen von Riechzellen, den I. Typ, die "funktionierenden" Riechzellen mit kleinen, runden, chromatinreichen Kernen im oberflächlichen Bereich des Epithels und den II. Typ, die "ruhenden" oder "restierenden" Riechzellen mit ovalen, relativ großen, chromatinarmen Kernen, zwischen Basal- und Typ I-Riechzellen gelegen. In Präparaten, sowohl der normalen Schleimhaut, als auch der Riechschleimhaut nach experimenteller Degeneration der Rezeptoren, beobachtete er mitotische Teilungen ausschließlich der ruhenden Zellen, welche er als Vorläufer der funktionierenden Zellen ansieht.

An bis zu 2 Monate alten Hunden und Katzen untersuchte ANDRES (3) 1965 die mitotische Teilung und Differenzierung von "Blastemzellen" im olfaktorischen Neuroepithel. Diese zwischen Hüll- und Basalzellzytoplasma gelegenen, kontrastarmen Zellen mit ihren relativ großen Perikarya sind auch bei adulten Individuen nachweisbar, ebenso wie Mitosen in dieser

Zone (3,4).

Untersuchungen mittels Autoradiographie zeigten schließlich einen kontinuierlichen Turnover der Neuronen, als deren Ursprung die basalen Elemente des Neuroepithels identifiziert wurden (40,46,47,49,105). Injektion von ^3H -Thymidin führt zur radioaktiven Markierung von Nuclei in der Phase der DNA-Replikation. Das radioaktive Nucleosid wird anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. So können Zellen durch alle Teilungs- und Differenzierungsstadien bis zum Zelltod verfolgt werden.

Schon am 1. Tag post injectionem zeigen Zellgruppen an der Epithelbasis radioaktive Markierung. Die gekennzeichneten Elemente wandern mit fortschreitender Versuchsdauer in Richtung Epitheloberfläche und sind in der Mehrzahl nach ca. 30 Tagen nicht mehr nachweisbar (bei Maus und Ratte) (49).

Das Stammzellreservoir der Rezeptorzellen bilden demnach Zellen mit unmittelbarem Kontakt zur Basalmembran, d.h. die "typical basal cells" (47,49). Sie stellen Ruhestadien direkter Neuronenvorstufen dar (117). Schätzungen ergaben Werte von ca. 90% für Basalzellen, die sich zu Sinneszellen differenzieren, während ca. 10% der Basalzellen weiter mitotische Teilungen durchlaufen (107). Auch 2 Monate nach Injektion von ^3H -Thymidin sind markierte, undifferenzierte Basalzellen nachweisbar (46).

Zwischen diesen Zellen und den olfaktorischen Rezeptoren liegen die "globose basal cells" (47,49), "large pale cells" (83), "real progenitor cells" (117), "ruhenden Riechzellen" (108), "Blastemzellen" (3,4) als Entwicklungsstadien im Differenzierungsprozeß zu reifen Neuronen, die schließlich über ihre Axone direkt mit dem ZNS in Verbindung stehen (47).

Der kontinuierliche Reifungs- und Alterungsvorgang der olfaktorischen Nervenzellen endet in der Verschleißdegeneration der kompletten Zelle bis zum Zelltod.

Mitotische Teilungen der Stützzellen verlaufen in situ, wobei die Mitoserate wesentlich niedriger ist als die der Basalzellen (40,49,74,106). Die autoradiographische Markierung der Stützzellkerne zeigt keine Veränderung des Musters innerhalb der 30 Tage-Periode (40,49).

2.4.1.2. Lebensdauer der olfaktorischen Sinneszelle

Die limitierte Lebensspanne der Riechzellen scheint nicht durch Umweltreize bedingt, sondern genetisch determiniert zu sein (47). Innerhalb der Gruppe der warmblütigen Wirbeltiere stimmt der zeitliche Ablauf des Turnovers weitgehend überein. Bei verschiedenen Spezies, z.B. Taube, Maus, Ratte, Hamster, ermittelte Werte liegen bei 25 - 35 Tagen (47,52,118), wovon ca. 1 Woche auf die Differenzierung von Vorstufen in reife Rezeptorzellen entfällt (47,97). Bei Fröschen nimmt der Zyklus längere Zeit -ca. 6 - 8 Wochen- in Anspruch (43).

Der Steuerungsmechanismus von physiologischer Degeneration und Rekonstitution dieser Neuronen ist unbekannt. Es wird vermutet, daß unter physiologischen Verhältnissen numerisch sich entsprechende Teilungs- und Reifungs- bzw. Degenerationsraten vorliegen, und auf diese Weise die Zahl der funktionstüchtigen Nervenzellen annähernd konstant bleibt (105,127,128). Übermäßiges Zugrundegehen von Riechzellen, wie nach experimenteller Degeneration führt zum Anstieg der Mitoserate in der Basalzellschicht (44,96,117). Angenommen wurde sowohl die Synthese einer hypothetischen Substanz durch degenerierende Zellen, welche die Differenzierung neuer Rezeptorzellen auslösen könnte, als auch die Hemmung der Entwicklung weiterer Stammzellen durch einen von reifenden Neuronen abgegebenen Stoff (48,49).

2.4.1.3. Biochemische Veränderungen

Durch Darstellung riechzellspezifischer Marker, die entweder ausschließlich in diesen Zellen vorkommen, wie das "olfactory marker protein" (=OMP) (68,76), oder dort in sehr viel höherer Konzentration als in anderen Geweben nachweisbar sind, wie Carnosin (30,77) und Carnosinsynthetase (55), konnten biochemische Beweise für den physiologischen Turnover erbracht werden.

Experimentelle Degeneration der Sinneszellen führt zu einem raschen Abfall mit anschließendem Wiederanstieg des OMP-, Carnosin- und Carnosinsynthetasegehaltes in Bulbus olfactorius und Riechepithel (30,55,56,80). Minimale Konzentrationen werden nach Axotomie der Fila olfactoria im Verlauf der zweiten Woche erreicht. Die Werte 1 Monat post operationem liegen bei 80% der Ausgangswerte (56).

Behandlung mit den Mitoseinhibitoren Colchizin, welches die Bildung des Spindelapparates bei der Zellteilung und den exoplasmatischen Fluß beeinträchtigt, und Ethidiumbromid, welches die DNA-Synthese inhibiert, hat den fast völligen Verlust der Carnosinsynthetaseaktivität zur Folge. Dieser Prozeß wird begleitet von einem deutlichen Gewichtsverlust des Bulbus olfactorius und einer geringeren ^3H -Thymidininkorporation in die Epithelzellen (57).

Die Konzentrationsänderungen der Markersubstanzen stimmen im zeitlichen Ablauf mit den morphologischen Erscheinungen der Degeneration und Rekonstitution reifer Rezeptorzellen überein (56,57).

2.4.1.4. Funktionsfähigkeit neugebildeter Riechzellen

Mit elektrophysiologischen und ethologischen Methoden wurde versucht, die Frage nach der Funktionsfähigkeit zu klären.

Stimulation der Riechschleimhaut durch Duftstoffe ruft in der Rezeptorregion ein Potential hervor, das als Elektroolfaktogramm (=EOG) registriert werden kann. Die Amplitude des EOGs sinkt innerhalb der ersten 10 Tage nach Axotomie der olfaktorischen Nervenfasern auf den Nullwert, steigt wieder an, und erreicht schließlich den Ausgangswert, wobei zu jeder Zeit Kurvenform und zeitlicher Ablauf der Reizantwort charakteristisch für den entsprechenden Stimulus sind (127). Diese am Salamander gewonnenen Ergebnisse bestätigen Resultate von Experimenten an Fröschen und Tauben (112,134,137,142).

Das Auftreten fortgeleiteter Aktionspotentiale zeigt denselben Verlauf wie die EOG-Amplitude: Dem Verlust der Aktionspotentiale folgt die langsame Wiederherstellung der elektrophysiologischen Aktivität (128).

Auch olfaktorisch vermitteltes Verhalten tritt mit Rekonstitution der Nervenzellen wieder auf. Tauben, die vor einigen Monaten einer Durchtrennung der Nervenfasern unterzogen wurden, sind in der Lage zu erlernen, bestimmte Duftstoffe zu unterscheiden. Zeitraum und Ablauf der Konditionierung entsprechen jenen nichtoperierter Tiere. Vor der Axotomie konditionierte Tauben verlieren diese Fähigkeit post operationem; das antrainierte Verhalten kehrt jedoch zurück. Als Voraussetzung hierfür wird die Kontaktaufnahme und Synapsenbildung zwischen Sinnes- und Mitralzellen angenommen (112,142).

Behandlung von Mäusen mit Mitoseinhibitoren hatte bei fast allen Tieren das Verschwinden eines vorher erlernten, über den Geruchssinn ausgelösten Verhaltensmusters zur Folge (57).

Verlust und Wiederauftreten elektrophysiologischer Aktivität und olfaktorisch vermittelten Verhaltens korrelieren zeitlich mit biochemischen und morphologischen Veränderungen (54,127,128,129).

2.4.2. Morphologische Veränderungen

2.4.2.1. Differenzierungsprozeß

Bedingt durch den kontinuierlichen Teilungs- und Reifungsprozeß zeigen die neuralen Elemente des Riechepithels variierende zytologische Charakteristika. Im Verlauf der Entwicklung wandern die Zellkörper von der Basis an die Oberfläche des Epithels.

2.4.2.1.1. Basalzellen

Die direkt auf der Basalmembran gelegenen, undifferenzierten Stammzellen ähneln auch morphologisch den undifferenzierten Zellen eines gewöhnlichen Epithels (46): Unregelmäßige Zellbegrenzung und irregulär geformter Nucleus mit dichtem Heterochromatingerüst sind typisch für die Stammzellen. Das elektronendichte, mit Toluidinblau stark anfärbbare Zytoplasma enthält keine charakteristischen Organellen (47,49). Augenfällige Tonofilamentbündel durchziehen das Zytoplasma, ausgehend von desmosomalen bzw. hemidesmosomalen Verbindungen mit benachbarten Stütz- und Basalzellen bzw. der Lamina basalis (3,40,41,49). Zahl und Umfang dieser Bündel nehmen mit zunehmendem Differenzierungsgrad ab, während Zytoplasmaanteil und Kerngröße mit fortschreitender Reifung zunehmen. Der abgerundete Nucleus enthält neben deutlichen Nucleoli überwiegend Euchromatin. Im nur mehr schwach mit Toluidin anfärbaren und elektronendurchlässigen Zytoplasma steigen Zahl der teils in Rosetten angeordneten, freien Ribosomen sowie Umfang von rauhem Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat deutlich an (40,49). Als für dieses Entwicklungsstadium typische Organellen finden sich zahlreiche Basalkörperchen im apikalen Zytoplasmabereich (40,49,129).

2.4.2.1.2. Olfaktorische Neuronen

Die reifenden Zellen zeigen zunehmend die Bipolarität der olfaktorischen Sinneszellen. Dabei bilden die senkrecht zur Basalmembran orientierten, ovoiden Zellen einen apikalen und einen zentripetalen Fortsatz: Dendrit und Axon (47,49).

Die Basalkörperchen befinden sich am distalen Pol des Dendriten und werden nach dessen Erreichen der Epitheloberfläche und der Bildung des olfaktorischen Vesikels zum Ursprung der Cilien (47).

Die Axone wachsen bündelweise durch die Foramina der Lamina cribrosa des Ethmoids in die Schädelhöhle und enden im Bulbus olfactorius (50). Unreife Nervenfasern haben einen kleineren Durchmesser als reife Axone und enthalten sehr wenige Mikrotubuli und meist keine Mitochondrien (17).

2.4.2.2. Degeneration der Sinneszellen

Aufgrund der limitierten Lebensdauer zeigt stets ein Teil der olfaktorischen Rezeptorzellen progressive Merkmale der Degeneration. So wird die Elektronendichte und Anfärbbarkeit des Zytoplasmas mit Toluidinblau mit zunehmendem Alter der Zelle ausgeprägter (49,52). Dilatationen des Endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparates und der Mitochondrien mit nachfolgender Zerstörung der Organellen und das Auftreten von Vakuolen kennzeichnen den weiteren Verlauf (40,49,52,129). Lysosomen unterschiedlicher Dichte und Struktur werden der Zelloberfläche zu die überwiegenden Organellen (40,47,56). Lipofuszingranula, multivesikuläre Körper und konzentrisch angeordnetes, lamelläres Material füllen das Zytoplasma zu einem immer größeren Teil aus (40,49,129).

Die ersten degenerativen Veränderungen am Nucleus äußern sich morphologisch in Kondensation des Chromatins und Kernpyknose.

Häufig nachweisbar ist ein hellerer Ring im Kernzentrum, als "bull's eye"-Effekt bezeichnet (129). Ein späteres Stadium ist charakterisiert durch den Verlust der typischen Zellform und der Integrität der Kernmembran, gefolgt von Lysis der Zelle (129).

In den Axonbündeln der Lamina propria enthalten zugrunde gehende Nervenfasern ein elektronendichtes Axoplasma (129). Degenerierende Axonterminalen im Bulbus olfactorius zeigen nach Axotomie zum selben Zeitpunkt entweder zunehmende Elektronendichte oder zunehmende Elektronendurchlässigkeit der Matrix. Diese beiden Degenerationsformen scheinen unabhängig voneinander abzulaufen (50).

Wesentlich seltener tritt eine andere, eigenartige Form der Degeneration ohne Schrumpfung von Zelle und Zellkern und ohne zunehmende Elektronendichte des Zytoplasmas auf. Hier enthalten die betroffenen Zellen ein klares, geschwollenes Plasma mit wenigen Organellen. Der Nucleus liegt direkt unter der Epitheloberfläche distal der Stützzellkernreihe (26,96). Eine ähnliche Zelle wird beim Menschen beschrieben. Die Autoren (64,103) bezweifeln jedoch, daß es sich hierbei um ein Degenerationsstadium handelt, sondern schließen unter anderem aufgrund des intakten, euchromatischen Kernes und des zentripetalen Fortsatzes auf die Rezeptornatur dieser "microvillar cell". Ähnliche Zellen werden auch bei Tieren beschrieben und für Rezeptoren (5,71) oder auch für Vorläufer von Stützzellen (111) gehalten.

2.4.2.3. Beseitigung der Zellfragmente

Aus der Lamina propria ins Epithel eingewanderte Makrophagen phagozytieren die bei der Degeneration anfallenden Zelltrümmer. Experimentelle Zerstörung führt zu einem Anstieg der Zahl phagozytischer Zellen, welche große Phagosomen enthalten, in denen teilweise noch Zellbestandteile, wie Fragmente des Endoplasmatischen Retikulums oder des Golgi-Apparates,

erkennbar sind (40,47,49,52,56,96). Einige Autoren nehmen demgegenüber an, daß die Stützzellen zur Phagozytose befähigt sind (129,136).

In der Lamina propria beseitigen die Hüllzellen der Axonbündel die zugrundegegangenen Nervenfasern. Experimentelle Degeneration der Riechzellen hat die Schwellung der Hüllzellfortsätze zur Folge, welche elektronendichtes, degeneriertes Material und Vakuolen enthalten (129).

Ebenso finden sich Phagosomen in den Gliazellen der Glomerula im Bulbus olfactorius, die teilweise deutlich die Struktur degenerierter Axonterminalen zeigen (45,48,50,56).

2.4.3. Experimentelle Degeneration der Riechzellen

2.4.3.1. Chemische Irritation

Reizung der Nasenschleimhaut mit wässriger ZnSO_4 -Lösung führt zur selektiven Zerstörung des olfaktorischen Epithels (16,83,130). Der destruktive Effekt auf das respiratorische Epithel ist wesentlich geringer (82). Behandlung mit 1 %iger ZnSO_4 -Lösung hat sehr unterschiedliche Degenerationsgrade, auch innerhalb eines Tieres, zur Folge; angefangen von einer weitgehend spezifischen Destruktion der Sinneszellen bis zur völligen Freilegung der Basalmembran (16,84,85). Das Ausmaß der Schädigung scheint vor allem von der Kontaktdauer mit den chemischen Medien abhängig zu sein (16). Stets folgt die völlige Wiederherstellung des olfaktorischen Epithels unabhängig vom Zerstörungsgrad (16,83,84,85,124,131).

Applikation von N-Methyl-Formimino-Methyl-Ester, einer leicht flüchtigen Substanz, betrifft selektiv die Riechzellen. Es kommt zu deren Zerstörung und Rekonstitution (117).

2.4.3.2. Axotomie

Nach Axotomie, d.h. Durchtrennung der Fila olfactoria, ist bei allen Versuchstieren, unter anderem Fröschen, Tauben, Mäusen, Ratten, Hamstern und nichthumanen Primaten, irreversible, retrograde Degeneration aller jener Nervenzellen, deren Faser von der Läsion betroffen wird, nachweisbar. Die übrigen Elemente der Riechschleimhaut - Basalzellen, unreife Neuronen, deren Axone die Axotomiestelle noch nicht erreicht haben, Stützzellen und Drüsenzellen - lassen keinerlei degenerative Erscheinungen erkennen (43,44,47,48,52,96, 108,118,129).

Der Degenerationsprozeß verläuft unter denselben morphologischen Veränderungen wie im physiologischen Fall, jedoch deutlich 'schneller. Bereits 24 Std post operationem zeigen die Perikarya exotomierter olfaktorischer Neuronen bei Ratten und Mäusen Erscheinungen, die auf den baldigen Zelltod schließen lassen (48,50). Alle von dem operativen Eingriff betroffenen Sinneszellen verschwinden aus dem Epithel innerhalb von 5 - 10 Tagen (44,48,97). Bedingt durch den Verlust reifer Neuronen, setzt sich das Riechepithel nur mehr aus Stütz- und Basalzellen sowie unreifen Nervenzellen zusammen und hat auffällig an Dicke verloren (96).

Im Bulbus olfactorius betrifft die Degeneration ausschließlich die olfaktorischen Axone der peripheren Nervenfaserschicht und der Schicht der Glomerula. Die sensorischen Axonendigungen verschwinden vollständig aus den Glomerula, die sich zu diesem Zeitpunkt nur aus Dendriten von Mitralzellen und periglomerulären Zellen, sowie hypertrophierten Gliazellen zusammensetzen, und deren Umfang dadurch auf ca. zwei Drittel der normalen Größe abnimmt (48,50).

Die Degeneration der Rezeptorzellen wird von einer Erhöhung der Mitoserate in der Basalschicht des Epithels gefolgt (44,52,96,97). Die sich entwickelnden Zellen sind in Gruppen

angeordnet (96).

Von der Läsion verschonte Axone wachsen weiter und stellen den ersten Kontakt zum ZNS wieder her (50,52).

Bei warmblütigen Wirbeltieren kommt es innerhalb von ca. 30 Tagen zur Restitutio ad integrum (47,48,50,52,96).

2.4.3.3. Bulbektomie

Partielle oder totale Entfernung des Bulbus olfactorius bei Mäusen hat, ähnlich der Axotomie, die Degeneration der betroffenen Sinneszellen und deren anschließende Rekonstitution zur Folge. Interessanterweise ist die Fähigkeit von Stammzellen zur Differenzierung unabhängig vom Vorhandensein eines intakten Bulbus (45,97,108): Regenerierende Nervenzellen sind nach Bulbektomie in der Lage, untypische neurale Gebiete, insbesondere Teile des Telencephalons, zu innervieren und dort die Bildung glomerulümähnlicher Strukturen zu induzieren. Dabei werden assymmetrische Synapsen zwischen den charakteristischen sensorischen Endverzweigungen der Riechzellen und Dendriten lokaler Neuronen gebildet (45,97).

Wechsel der Nervenfasern auf die kontralaterale, nichtoperierte Seite wurde nicht beobachtet (45).

Bei neonatalen Mäusen führte die Transplantation von Teilen des occipitalen Cortex und des Bulbus olfactorius anderer Tiere an die Stelle des entfernten Bulbus ebenfalls zur Innervation des Fremdgewebes und zur Ausbildung von Glomerula (51).

2.5. Immunhistochemie

2.5.1. Prinzip der Immunhistochemie

Zur histologischen und zytologischen Lokalisation antigen wirkender Stoffe wird die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung genutzt. So können Gewebskomponenten in situ ohne vorherige Extraktion mittels spezifischer Antikörper dargestellt werden. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch Koppelung an eine licht- oder elektronenmikroskopisch sichtbare Substanz nachgewiesen. Die Antikörper werden nach Injektion des gereinigten Antigens von Tieren einer zweiten Species gebildet (133).

2.5.2. Antigene in Zellen der normalen Riechschleimhaut

2.5.2.1. OMP (=olfactory marker protein)

Das "olfactory marker protein", ein niedermolekulares (geschätztes Molekulargewicht 35.000) (78), saures, lösliches Protein wurde von MARGOLIS 1972 entdeckt und erstmals aus dem Bulbus olfactorius der Maus isoliert (76).

Phylogenetisch ist dieses Protein weit verbreitet: Nachgewiesen wurde es bisher bei Fischen, Fröschen, Mäusen, Ratten, Schweinen, Schafen, Rindern, Hunden und Menschen (68).

OMP ist ausschließlich in der Riechschleimhaut und den peripheren Schichten des Bulbus olfactorius, sowie dem Vomeronasalorgan und dem Bulbus olfactorius accessorius enthalten (58). Innerhalb dieser Gewebe ist es selektiv in reifen olfaktorischen Neuronen lokalisiert (98); die übrigen zellulären Bestandteile des Riechorgans, beispielsweise Basal-, Stütz- und Hüllzellen, wie auch alle anderen untersuchten neuronalen und nichtneuronalen Gewebe enthalten dieses Protein nicht (68,76).

Intrazellulär verteilt sich OMP über das gesamte Zytoplasma, vom olfaktorischen Vesikel bis in die Axonendigungen des Bulbus (98), wobei die Synthese innerhalb des Riechepithels stattfindet, und das Protein entlang der zentralen Nervenfortsätze zu den Endstrukturen im ZNS transportiert wird (81). OMP stellt kein membranassoziiertes Protein dar (79). Der relativ langsame Transport von OMP läuft bei adulten Mäusen mit einer Geschwindigkeit von schätzungsweise 2 - 4 mm/Tag ab. Bei Jungtieren und Tieren mit regenerierender Riechschleimhaut (nach experimenteller Destruktion) sind Transport- und Turnoverrate deutlich höher (69).

OMP scheint einen Indikator für das Erreichen der Funktionsfähigkeit der Rezeptorzelle darzustellen, obwohl die ursprüngliche Annahme, daß die OMP-Synthese erst mit Ausbildung synaptischer Verbindungen zwischen Riechzelle und sekundärem Neuron einsetzt (29,99), wahrscheinlich nicht zutrifft. Versuche an unilateral bulbektomierten Mäusen zeigten, daß es, trotz Verhinderung einer Kontaktaufnahme der regenerierten Sinneszellen mit dem ZNS, zu Differenzierung und Reifung der Neuronen und zur OMP-Produktion kommt (95). In Organkulturen bilden olfaktorische Nervenzellen Axone und Dendriten aus, OMP wird jedoch nicht synthetisiert (29).

Im Lauf der Differenzierung einer Riechzelle ist OMP ca. 7 Tage nach Inkorporation von ^3H -Thymidin in die Stammzellen in radioaktiv markierten Zellen nachweisbar, also erst in reifen Neuronen (94). Retrograde Degeneration der Rezeptorzellen durch Irritation mit ZnSO_4 -Lösung oder Bulbektomie führt zu einem Abfall der OMP-Konzentration (79). Ebenso ist ca. 5 Tage nach Axotomie der Fila olfactoria in der Riechschleimhaut kein OMP mehr vorhanden; ca. 30 Tage post operationem erreicht der OMP-Gehalt wieder den Ausgangswert. Diese Beeinflussung der OMP-Konzentration durch experimentelle Degeneration der Sinneszellen korreliert mit dem Verschwinden und Wiederauftreten reifer Neuronen (56).

Während der Ontogenese zeigen Riechzellen, zunächst perinukleär, positive Reaktion mit OMP-Antiserum frühestens ab dem 14. Trächtigkeitstag bei Mäusen, ab dem 18. Tag bei Ratten (29,99). Somit erscheint OMP bei der Maus ca. 1 Tag nach der ersten elektronenmikroskopischen Identifikation von Synapsen zwischen olfaktorischen Axonen und Mitralzellen. Ein mit der Reaktion bei adulten Tieren vergleichbares Ergebnis erhält man erst 2 - 4 Wochen p.p. (29).

Die biologische Bedeutung des "olfactory marker protein" ist bislang ungeklärt. Unterschiedlichste Hypothesen wurden aufgestellt: OMP könnte eine Vorläufersubstanz von Hormonen oder Neurotransmittern bzw. deren Endprodukte darstellen (78), fördernden Einfluß auf die Entwicklung des Bulbus olfactorius ausüben oder sogar eine spezifische Rolle bei der Geruchsempfindung spielen (94). In Analogie zu NSE (siehe 2.5.2.2.) könnte es sich bei OMP um ein spezielles Isoenzym einer in allen Zellen ablaufenden biochemischen Reaktion handeln oder auch zellstoffwechselregulierende Funktion besitzen (79).

Bisher ist OMP das einzige nur in einer einzigen Neuronenart, der olfaktorischen Sinneszelle, nachweisbare und auf einen bestimmten Abschnitt der Lebensdauer der Zelle beschränkte Protein.

2.5.2.2. NSE (=neuron-specific enolase)

Enolase, ein Enzym der Glykolyse, katalysiert den Reaktionsschritt von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat (53,120,122). Diese Isoenzyme sind Dimere aus drei immunologisch verschiedenen Untereinheiten α , β , γ mit Molekulargewichten von ca. 100.000 und unterschiedlicher Lokalisation (53).

Am weitesten und in zahlreichen Geweben verbreitet ist die α -Enolase ($\alpha\alpha$), während β -Enolase ($\alpha\beta$ und $\beta\beta$) weitgehend auf Skelett- und Herzmuskulatur beschränkt ist (53).

Die einzige im Zusammenhang mit dieser Arbeit interessante Form, die "neuron-specific enolase" (=NSE) oder γ -Enolase, welche mit dem von MOORE 1972 (101) aus Rinderhirnen isolierten 14-3-2 Protein identisch ist, setzt sich aus α und γ - oder aus 2 γ -Untereinheiten zusammen (53,120,122).

Nachgewiesen wurde NSE zunächst nur in Neuronen (122), wo das Enzym im Zytoplasma der ganzen Zelle verteilt ist, jedoch vom Zellkörper aus mittels langsamen axonalen Transportes die Nervenendigungen erreicht (120). Das erstmalige Auftreten von NSE in Nervenzellen während der Ontogenese scheint mit der funktionellen Reife der Zellen korreliert zu sein (122). Weitere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, daß während der Fetalentwicklung des Gehirns ein Wandel von α -Enolase zu γ -Enolase erfolgt (53).

Neben neuronalen Zellen zeigen neuroendokrine Zellen (Zellen des APUD(=amine precursors uptake and decarboxylation)-Systems) positive Reaktion mit NSE-Antiserum: Zellen des Hypophysenvorderlappens, des Glomus caroticum, die parafollikulären Schilddrüsenzellen, endokrine Zellen im Magen-Darm-Pankreas-Bereich und Zellen des Nebennierenmarks enthalten NSE (121).

Auch in bestimmten sensorischen Zellen wie Geschmacksrezeptoren (136) und Merkelschen Tastrezeptoren der Haut (136,144) konnte das Enzym nachgewiesen werden.

Alle diese Zellen werden aufgrund morphologischer und funktioneller Ähnlichkeit mit Neuronen als Paraneuronen bezeichnet (32).

Weitere Gewebe enthalten ebenfalls NSE, wenn auch in wesentlich geringerem Umfang und v.a. als $\alpha\gamma$ -Enolase im Gegensatz zu Nervenzellen, in denen die $\gamma\gamma$ -Form deutlich überwiegt (53,120). Als NSE-positiv erwiesen sich unter anderem beim Menschen glatte Muskelzellen vieler Organe (z.B. Blutgefäße,

Gastrointestinaltrakt), die Myoepithelzellen in Speichel-, Schweiß- und Milchdrüsen, Plasmazellen, ein Großteil der T-Lymphozyten und Thrombozyten (53).

Auch in der Riechschleimhaut menschlicher Feten (12 - 22 Schwangerschaftswoche) zeigen zahlreiche olfaktorische Rezeptorzellen des Epithels immunologische Reaktion mit NSE-Antikörpern. Intensive Färbung lassen Perikaryon, Dendrit und olfaktorischer Vesikel erkennen, während das Axon nur schwach positiv reagiert. Der Zellkern, ebenso wie alle übrigen Zellen des Riechepithels sind NSE-negativ. In der Lamina propria kann in allen Nervenbündeln unabhängig von Lage und Größe NSE nachgewiesen werden (136).

2.5.2.3. NFP (=neurofilament protein)

NFP stellt als Bestandteil der Neurofilamente ein nervenzellspezifisches Antigen dar (145), konnte aber auch in einigen endokrinen Paraneuronen nachgewiesen werden (136).

In der Riechschleimhaut menschlicher Feten ist die positive Reaktion innerhalb des Epithels auf den apikalen Zytoplasmabereich, den Dendriten und olfaktorischen Vesikel der Sinneszellen beschränkt. Basales Zytoplasma und Axon sind NFP-negativ, wie auch die übrigen Epithelzellen. In der Lamina propria enthalten ausschließlich die umfangreichen, in tieferen Regionen gelegenen Nervenbündel NFP (136). Die subepithelialen NSE-positiven aber NFP-negativen Nervenbündel scheinen reine olfaktorische Nerven zu sein, während NSE- und NFP-positive Bündel in tieferen Bereichen der Lamina propria möglicherweise nichtolfaktorischen Ursprungs sind, sondern z.B. Fasern des N. trigeminus enthalten (136).

Der immunhistochemische Nachweis für NFP gelang erst in der Riechschleimhaut älterer Feten (ab der 16. Schwangerschaftswoche); die olfaktorischen Sinneszellen adulter Ratten und Hunde reagieren konstant mit NFP-Antikörpern (136).

2.5.2.4. S 100 (=S 100-Protein)

S 100, ein saures, gut lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 20.000 - 22.000 (102) setzt sich aus zwei verschiedenen Polypeptiden α und β zusammen, wobei die Kombination aus zwei β und aus α - und β -Ketten überwiegt. MOORE isolierte 1965 dieses Protein (100). Bei den meisten Säugern stimmt das Eiweißmolekül in strukturellen und immunologischen Eigenschaften überein (135): Antiserum gegen Rinder-S 100 reagiert mit Geweben aller Wirbeltiere (102).

Astrozyten und Oligodendrozyten des ZNS ($\alpha\beta$) (63,73), Schwannzellen peripherer Nerven ($\beta\beta$) (102) und Satellitenzellen in Ganglien ($\beta\beta$) (135) zeigen positive Reaktion mit S 100-Antikörpern. Demgegenüber enthalten Neuronen die α -Form des S 100 Proteins, welche mit dem üblichen gemischten S 100-Antiserum nicht reagiert, so daß innerhalb des Nervensystems dieses Protein als glia-spezifisch gelten kann (135).

Das außergewöhnlich gut lösliche S 100-Protein kommt zu einem geringen Prozentsatz in membrangebundener Form vor: Bei Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen bindet S 100 Ca^{2+} , wodurch es zu einer Konformationsänderung und zur Exposition einer hydrophoben Gruppe kommt und damit zur reversiblen Bindung an Membranen (102).

Auch in zahlreichen Zellen außerhalb des Nervensystems findet sich S 100: Unter anderem ist es in Melanozyten, Chondrozyten, interstitiellen Epiphysen- und Adenohypophysenzellen nachweisbar (135).

In der Riechschleimhaut menschlicher Feten lassen sich innerhalb des Epithels keine S 100-positiven Zellen erkennen, während in der Lamina propria intensive Reaktion in den Hüllzellen aller NSE-positiven und/oder NFP-positiven Nervenbündel auftritt (136).

2.5.2.5. GFAP (=glial fibrillary acidic protein)

GFAP mit einem Molekulargewicht von ca. 47.000 (133) wurde von ENG et al. 1971 (28) erstmals isoliert und als Bestandteil von Astrozyten des ZNS bestimmt (11). Astrozytäres GFAP ist sowohl diffus im Zytoplasma verteilt als auch mit Gliafilamenten assoziiert (119,145) sowie in normalen, reaktiven und neoplastischen Astrozyten nachweisbar (37).

Weitere Zelltypen des ZNS, die Bergmann-Glia des Cerebellum und Tanyzyten um den III. Ventrikel sind immunhistochemisch GFAP-positiv (73,119).

Außerhalb des ZNS reagieren Zellen der Plexus myentericus und submucosus (65), sowie eine Subpopulation Schwannscher Zellen des N. ischiadicus mit GFAP-Antikörpern (22,145). Die GFAP-Verteilung in den Schwannzellen deckt sich dabei mit der Verteilung der 10 nm-Filamente, welche bündelweise in den Schwannzellfortsätzen um myelinscheidenfreie Nervenfasern liegen (22).

BARBER und LINDSAY (6) wiesen 1982 GFAP in den Hüllzellen der olfaktorischen Nervenfasern sowohl perinukleär als auch in den Fortsätzen nach, wobei das Protein wie in Astrozyten diffus im gesamten Zytoplasma verteilt und in Verbindung mit Filamentbündeln vorliegt. Membranumschlossene Organellen und der Nucleus sind GFAP-negativ. GFAP-positive Reaktion zeigen diese Hüllzellen nicht nur in histologischen Schnitten, sondern auch in Zellkulturen.

2.6. Riechschleimhauttumoren

Im Rahmen der WHO-Tumorklassifikation werden Riechschleimhauttumoren folgendermaßen definiert: "Überwiegend maligne Tumoren, die vom olfaktorischen Epithel ausgehen und je nach Differenzierungsgrad als Aesthesioneurocytome, Aesthesioneuroepitheliome oder Aesthesioneuroblastome angesprochen werden können" (126).

Diese Tumoren treten nur sehr selten auf: Beim Menschen umfassen sie ca. 3% aller Nasentumoren (125). Im Gegensatz zu "echten" Neuroblastomen des zentralen, peripheren und vegetativen Nervensystems, die am häufigsten in den ersten Lebensabschnitten auftreten, beim Menschen v.a. innerhalb der ersten 5 Lebensjahre, liegt das Maximum der Häufigkeit von Riechschleimhauttumoren in der Lebensmitte oder zweiten Lebenshälfte (23). Am häufigsten sind Menschen im Alter zwischen 51 und 60 Jahren, gefolgt von 11- bis 20jährigen betroffen; nur ca. 5% aller einschlägig erkrankten Menschen sind unter 10 Jahre alt (27).

Seit BÉRGER et al. 1924 und 1926 (9,10) erstmals neuroepitheliale Tumoren der olfaktorischen Schleimhaut beim Menschen beschrieben und als "ésthésioneuroépitheliome" bzw. "ésthésioneurocytome olfactif" bezeichneten, wurden über 200 weitere Fälle beim Menschen veröffentlicht. McGAVRAN unternahm 1970 (86) die erste elektronenmikroskopische Untersuchung derartiger Tumoren.

Nur sehr wenige Berichte liegen über Tumoren der Riechschleimhaut bei Säugetieren vor: ANDERSON und CORDY 1981 (2) fanden bei einer 14 Monate alten Kalbin ein wenig differenziertes Ästhésioneuroblastom; die Auswertung erfolgte jedoch nur lichtmikroskopisch. Spontane Ästhésioneuroblastome bei zwei 3 bzw. 6 Jahre alten Katzen wurden von POSPISCHIL und DAHME 1981 (114) und bei einer 7jährigen Katze und einem 12jährigen Hund von DAHME et al. 1985 (23) beobachtet. Eben-

falls 1985 berichteten LOUPAL und MIKULA (72) von einem Olfaktoriusneuroblastom eines 16jährigen Pferdes.

Von Ästhesioneuroepitheliomen existieren auch beim Menschen nur wenige Berichte. Unter anderem beobachteten HASSOUN et al. (59) einen derartigen Tumor mit relativ hohem Differenzierungsgrad.

Experimentell konnten durch Nitrosamine Riechschleimhauttumoren v.a. des ästhesioneuroepithelialen Typs bei Goldhamstern (60,61,91) und bei Ratten (139,140) ausgelöst werden.

Ob das Auftreten eines Tumors der olfaktorischen Schleimhaut bei einem nichtmenschlichen Primaten auf mykotoxikologische Versuche zurückzuführen ist oder ob es sich um einen Spontantumor handelte, ist ungeklärt (21).

2.6.1. Morphologie

Die große Variationsbreite der lichtmikroskopischen Struktur erschwert häufig die Diagnose der Riechschleimhauttumoren, weshalb elektronenmikroskopische Untersuchungen wünschenswert erscheinen (92,114).

Als morphologische Charakteristika für Ästhesioneuroblastome gelten das Auftreten neurosekretorischer Granula (dense core vesicles), neurotubulärer und -filamentärer Elemente (18,20,23,62,66,72,113,114,123,132,138). Ausbildung echter Rosetten und/oder Pseudorosetten wird in der Mehrzahl der Fälle (2,18,23,72,92,110,114,138), jedoch nicht konstant beobachtet. Axonale Fortsätze (2,18,66,113,114,132) lassen sich ebenfalls nicht in jedem Fall erkennen.

Einem beim Menschen beschriebenen und als Ästhesioneuroepitheliom diagnostizierten Tumor fehlen Transmittervesikel, die neoplastischen Zellen bilden jedoch echte Rosetten mit

apikalem Microvillibesatz und Basalmembranen (59). Beim Hund ließ ein ebenfalls als Ästhesioneuroepitheliom klassifizierter Tumor zahlreiche Kinetosomen und Sinnesgeißeln, die in Rosettenlumina ragen oder interzellulär lokalisiert sind, erkennen (23).

2.6.2. Immunhistochemie

Mit der Absicht, weitere Kriterien für eine exakte Diagnosestellung von Riechschleimhauttumoren zu finden, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

Alle bisher untersuchten, menschlichen Tumoren enthalten NSE (=neuron-specific enolase). In allen positiven Zellen ist die Immunreaktion diffus über das Zytoplasma verteilt; die Nuclei sind NSE-negativ (19,20,24). Die Verteilung der NSE-positiven Tumorzellen ist nicht homogen: Unregelmäßige Anhäufungen gefärbter Zellen lassen sich innerhalb der Tumorknoten erkennen. Manche Knötchen bestehen nur aus positiven Zellen, wie auch an Rosettenbildungen beteiligte Tumorzellen durchweg mit NSE-Antiserum reagieren. Neben der Verteilung variiert die Intensität der Reaktion deutlich (19).

S 100-Protein wurde ebenso in allen immunhistochemisch untersuchten Fällen nachgewiesen: Positive Zellen liegen überwiegend an der Peripherie von Tumorknötchen und bilden ein kontinuierliches, randständiges Netzwerk (19,20,24). Das Reaktionsmuster für S 100 korreliert mit der elektronenmikroskopisch dargestellten Anordnung von Schwann- bzw. Satellitenzellen an den Rändern der Tumorzellnester (19,20,24,123,138). Die Fortsätze dieser schwannzellähnlichen Zellen überlappen sich gegenseitig und bilden so eine zusammenhängende Umhüllung der Tumorzellknoten, die von einer Basalmembran umgeben wird. Intrazellulär ist S 100 mit dünnen zytoplasmatischen Filamenten assoziiert (20).

Nur ein Tumor (von 10) zeigte positive Reaktion mit GFAP (=glial fibrillary acidic protein)-Antikörpern. Bei diesem Fall war auch die S 100-Immunreaktion ungewöhnlich: Gleichmäßig über den ganzen Tumor verteilt waren gefärbte Zellen erkennbar. In den übrigen Tumoren waren nur normale, reaktive oder neoplastische Astrozyten GFAP-positiv (19).

Eine Neurofilamentprotein-Untereinheit wurde mit monoklonalen Antikörpern in Riechschleimhauttumoren dargestellt, während die beiden anderen Untereinheiten nicht nachgewiesen wurden. Der untersuchte Tumor war GFAP-negativ (141).

Chromogranin konnte in einzelnen neoplastischen Zellen oder Zellgruppen nachgewiesen werden; die Verteilung entspricht dem Auftreten neurosekretorischer Granula in Tumorzellen (24).

Diese spärlichen immunhistochemischen Untersuchungen haben, wie gesagt, ausschließlich Riechschleimhauttumoren menschlichen Ursprungs zur Grundlage.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Untersuchungsmaterial

Als Material dienten Proben der normalen Riechschleimhaut von 12 Hunden verschiedenster Rassen, im Alter von wenigen Stunden bis zu 9 Jahren und beiderlei Geschlechts (Tab. 1). Das Gewebe konnte unmittelbar nach Todeseintritt entnommen und verarbeitet werden. Keines der Tiere zeigte klinische Symptome für Erkrankungen im Bereich des Respirationstraktes sowie des Nervensystems.

Tab. 1:

TEM-Nr.	Rasse	Alter	Geschlecht
751	Dobermann	3-4 Stunden	ml
702	Dalmatiner	3 Monate	ml
711	Irischer Wolfshund- Mischling	1 Jahr	ml
736	Collie-Mischling	2 Jahre	ml
769	Deutscher Schäferhund	2 Jahre	ml
778	Mischling	2 Jahre	ml
779	Mischling	2-3 Jahre	wbl
710	Deutscher Schäferhund	2-3 Jahre	wbl
723	Deutscher Schäferhund	4 Jahre	wbl
719	Schäferhund-Mischling	4-5 Jahre	wbl
750	Schäferhund-Mischling	5 Jahre	ml
734	Beagle	9 Jahre	wbl

Die 10 untersuchten Tumoren der olfaktorischen Schleimhaut stammen aus dem Sektionsgut des pathologischen Institutes des Zeitraumes 1978 bis August 1986 (siehe 3.3.1.).

3.1.2. Elektronenmikroskopie

Jeweils 8 ca. 1-2 mm³ große Gewebeproben der normalen Riechschleimhaut wurden in phosphatgepuffertem 6,25 %igem Glutaraldehyd fixiert, in 1 %igem Osmiumtetroxid nachfixiert und bei 40° C in Epon eingebettet. Die Semidünnschnitte wurden mit Azurblau gefärbt, die Ultradünnschnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit einem Zeiss EM 10 ausgewertet.

Von einem Teil der Gewebeblocke wurden 10-30 Ultradünnschnitte umfassende Schnittserien angefertigt, wobei jeder 2. Schnitt verworfen wurde.

3.1.3. Immunhistochemie der Paraffinschnitte

Die lebensfrisch entnommene olfaktorische Schleimhaut wurde in 7 %igem gepuffertem Formalin fixiert, anschließend entkalkt und in Paraffin mit einem Erstarrungspunkt von 42-44° C eingebettet. Die ca. 8 um dicken Schnitte wurden auf mit Chromalaun behandelte Objektträger aufgezogen. Die Tumoren wurden routinemäßig in Paraffin mit einem Erstarrungspunkt von 56-58° C eingebettet. Die übrige Behandlung entsprach jener der normalen Riechschleimhaut. Histologische Gehirnschnitte dienten als Kontrollen für die Spezifität der verwendeten Antisera.

Als immunhistochemische Technik wurde die von STERNBERGER (133) beschriebene Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (PAP) angewendet.

Mittels Wärme bis maximal 58° C und Xylol werden die Schnitte entparaffiniert und über eine Alkoholreihe rehydriert. Um die endogene Peroxidaseaktivität, die im Gewebe vorhanden ist (z.B. in Erythrozyten und vielen Leukozyten), zu zerstören, werden die Schnitte mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung (für 5 min) bedeckt. Die anschließende Inkubation des Gewebes mit

Normalserum (Verdünnung 1:10) vom Schwein, jener Tierart, aus der der Brückenantikörper gewonnen wurde, dient zur Verhinderung unspezifischer Bindungen der nachfolgend verwendeten Antikörper an Gewebsproteine (Inkubationsdauer 20 min).

Die Primärantikörper, die mit den nachzuweisenden Gewebsantigenen reagieren -anti-GFAP, anti-NSE, anti-S 100- werden in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Diese Antikörper der Fa. Dakopatts werden aus Kaninchen gewonnen. Nach zwanzigminütiger Inkubation wird überschüssiger, d.h. ungebundener Primärantikörper mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS A-Lösung) abgewaschen, und das Gewebe 20 min in der Pufferlösung gebadet.

Im nächsten Reaktionsschritt bindet sich ein Brückenantikörper, aus dem Schwein gewonnenes Immunserum gegen Kaninchenprotein, an den Primärantikörper (Verdünnung 1:50, Inkubationszeit 20 min).

Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS A-Lösung werden die Schnitte mit dem PAP-Reagenz, gewonnen aus Kaninchen, inkubiert (Verdünnung 1:100, Inkubationszeit 20 min). Dieser aus Meerrettichperoxidase und Antikörper gegen dieses Enzym bestehende Komplex bindet sich spezifisch an die freien Antigen determinanten des Brückenantikörpers. Ungebundenes PAP-Reagenz wird durch Waschen entfernt.

Um diese bisher unsichtbare immunologische Reaktion darzustellen, wird Substrat nach NEXØ hinzugefügt, das aus 20 mg 3-Amino-9-Äthylcarbazol (AEC) gelöst in 5 ml Dimethylformamid und 95 ml Acetatpuffer (pH 5) besteht. Die AEC-Lösung wird filtriert und unmittelbar vor Gebrauch mit 50 µl 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung versetzt. AEC wird in einer durch die Peroxidase des PAP-Komplexes katalysierten Reaktion zu einer wasserunlöslichen, roten Verbindung oxidiert und markiert so die Lokalisation der Antigene innerhalb der Gewebeschnitte.

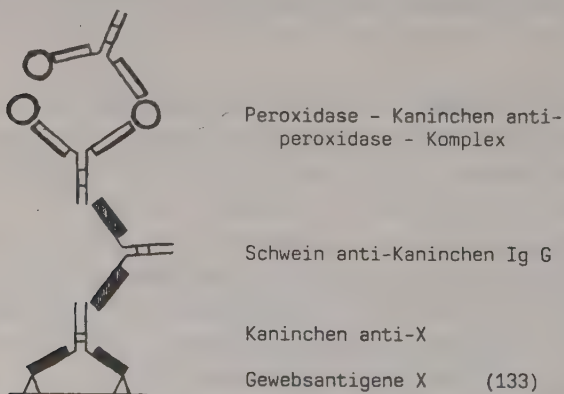
Sämtliche Reaktionsschritte werden bei Raumtemperatur ausgeführt. Die Schnitte werden teilweise mit Hämalaun gegengefärbt, teilweise ohne Gegenfärbung belassen und lichtmikroskopisch ausgewertet.

3.1.4. Immunhistochemie der Semidünnschnitte

2 um dicke Semidünnschnitte werden mit Chromalaun auf Glasobjektträgern fixiert. Um eine Reaktion der Antikörper mit den Bindungsstellen der entsprechenden Antigene des Gewebes zu ermöglichen, wird das Einbettungsmedium Epon mit einer Natriummethylatlösung entfernt (133): 5,87 g Natriummethylat wird gelöst in 50 ml einer Mischung aus Benzol und Äthanol im Verhältnis 1:1. Diese Stammlösung wird kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 mit dem Benzol/Äthanol-Gemisch (1:1) verdünnt. Die Semidünnschnitte werden mit dieser Gebrauchslösung bedeckt, nach 3 min abgespült und je 3 min lang in ein Benzol/Äthanol-, Azeton- und Aqua dest.-Bad getaucht.

Anschließend kann die PAP-Methode analog zu der Technik bei Paraffinschnitten mit auf 5 min verkürzten Inkubationszeiten durchgeführt werden.

Schema der PAP-Methode:



3.2. Die normale Riechschleimhaut des Hundes

3.2.1. Elektronenmikroskopie der normalen Riechschleimhaut

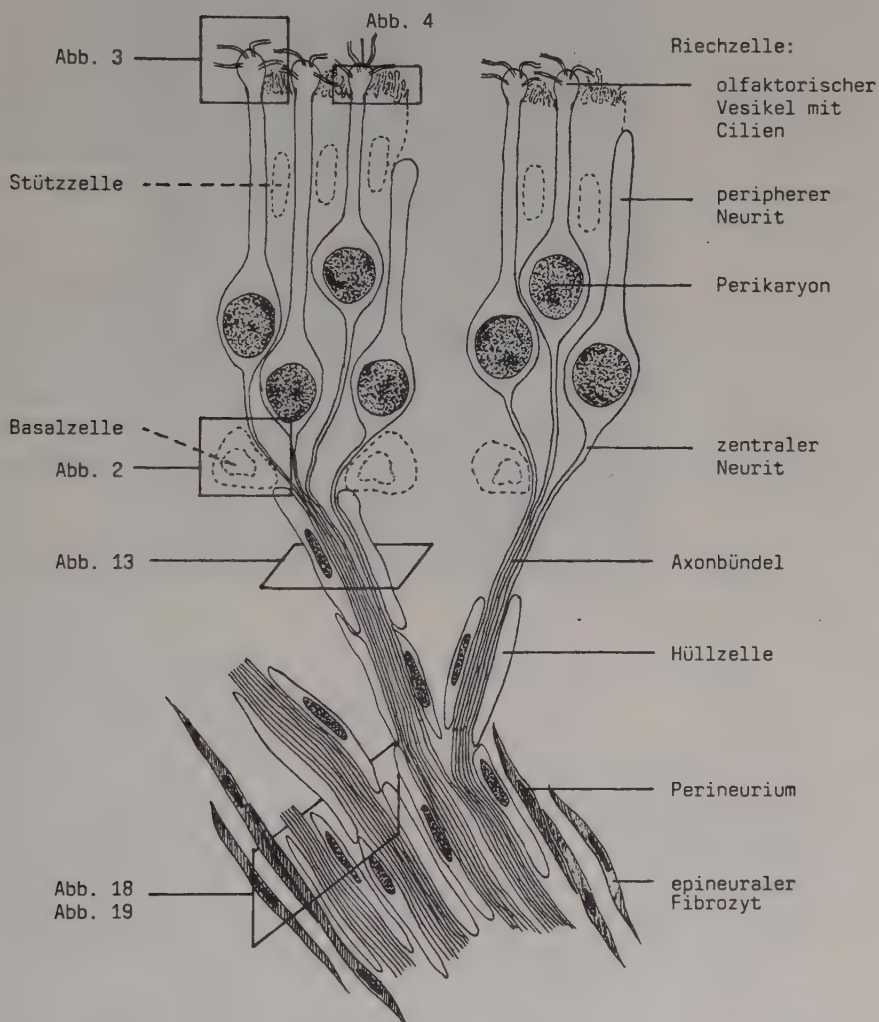


Abb. 1: Schematische Darstellung der neuralen Elemente der olfaktorischen Schleimhaut.

3.2.1.1. Basalzellen

Unmittelbar auf der Basalmembran des olfaktorischen Epithels liegen die typischen Basalzellen mit ihrem stark gelappten, unregelmäßigen, heterochromatinreichen Zellkern. Filamentbündel, die im Verlauf der Differenzierung der Basalzellen zu olfaktorischen Sinneszellen verloren gehen, durchziehen in allen Richtungen das Zytoplasma. Freie Ribosomen, Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat verteilen sich über die gesamte Zelle. In Zytoplasmäeinbuchtungen verlaufen mehrere Axone umfassende Nervenfaserbündel (Abb. 2).

Diese Basalzellen sind wie die Stützzellen über zahlreiche Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden. Zwischen den Basalzellen und zwischen Basalzellen und anderen benachbarten Zellen, wie Stützzellen, Hüllzellen und Zellen der Drüsenausführungsgänge, befinden sich Zonulae adhaerentes, desmosomale Verbindungen sowie vereinzelt auch tight junctions erkennen (Abb.2 und 2 Inset).

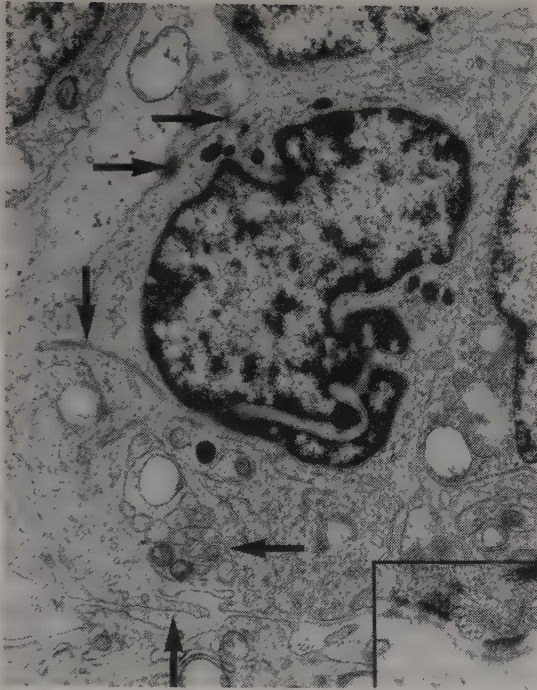


Abb. 2: TEM-Nr. 702/40/5
Dalmatiner, 3 Monate, ml
Vergr. 12 000 x

Epithelbasis: Typische, unmittelbar der Basalmembran (↑) aufliegende Basalzelle mit zytoplasmatischen Filamentbündeln (↓). Ein Axonbündel (←) verläuft in einer Zelleinbuchtung. Zu einer benachbarten Epithelzelle hin ist ein Desmosomenkomplex bzw. eine Zonula adhaerens (→) ausgebildet.

Abb. 2 Inset: TEM-Nr. 751/7/1/1
Dobermann, 3-4 Stunden, ml
Vergr. 19 000 x

Hemidesmosomen zwischen Basalzelle und Basalmembran.

3.2.1.2. Olfaktorische Sinneszelle

Die olfaktorische Sinneszelle stellt ein bipolares Neuron dar, mit einem peripheren, das Cavum nasale erreichenden Fortsatz und einem zentralen Axon, das im Bulbus olfactorius Synapsen bildet. Bei dem peripheren Riechzellfortsatz handelt es sich, aufgrund der für Axone charakteristischen Feinstruktur, wie bei dem zentralen Fortsatz um einen Neuriten (114). Demgegenüber wird dieser periphere Neurit in der einschlägigen Literatur als Dendrit bezeichnet.

3.2.1.2.1. Olfaktorischer Vesikel

Als Ursprung der Sinnesgeißeln liegen Basalkörperchen unmittelbar unter der Plasmamembran des olfaktorischen Vesikels. Diese zeigen den charakteristischen Aufbau aus neun Tubulustriplets, von denen je ein Basalfüßchen radiär im 45°-Winkel ausgeht. Ausgeprägte Wurzelfüßchen mit Querstreifung in 60 nm-Intervallen ziehen in Verlängerung der Cilien Richtung Perikaryon. Ihre Breite liegt bei ca. 45 nm; in Längsrichtung können sie bis ca. 1 µm Länge verfolgt werden (Abb. 3). Filamentäre und tubuläre Elemente sowie kleine Areale elektronendichten Materials finden sich neben klaren Vesikeln und seltenen Mitochondrien.

Die Cilien enthalten in ihrem proximalen Abschnitt neun Tubuluspaare, die zwei einzelne zentrale Tubuli umgeben (Abb. 3 Inset). Der überwiegende Anteil jeder Sinnesgeißel zeigt bei stark reduziertem Ciliendurchmesser nur mehr zwei einzelne Mikrotubuli.

Am Übergang des olfaktorischen Vesikels in den Schaft ist der (periphere) Neurit eingeschnürt (Abb. 3) und über ausgeprägte Verbindungskomplexe, bestehend aus Zonula occludens und Desmosomen, mit Nachbarzellen verbunden. Die Filamentbündel der desmosomalen Strukturen durchziehen parallel zur Schleimhautoberfläche das Stützzellzytoplasma (Abb. 4).



Abb. 3: TEM-Nr. 750/15/6/3
Schäferhund-Mischling, 5 Jahre, ml
Vergr. 24 000 x

Deutlich über das distale Ende der benachbarten Stützzellen hinausragender olfaktorischer Vesikel einer Rezeptorzelle als Endformation des peripheren Riechzellneuriten mit längsge-schnittenen Basalkörperchen (↓) und proximalen Cilienab-schnitten, Wurzelfüßchen (→), Vesikeln, elektronendichten Materials und Neurotubuli (←).

Abb. 3 Inset: TEM-Nr. 710/8/4
Deutscher Schäferhund, 2-3 Jahre, wbl
Vergr. 45 500 x

Querschnitt durch eine Cilie in deren proximalen Abschnitt.

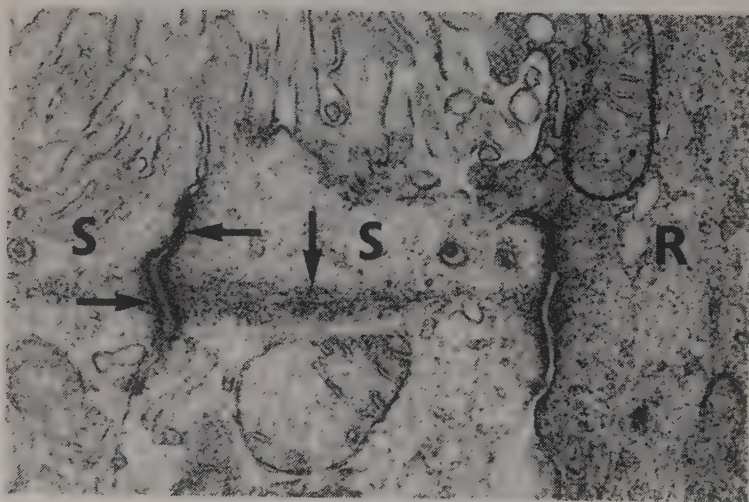


Abb. 4: TEM-Nr. 710/7/5
 Deutscher Schäferhund, 2-3 Jahre, wbl
 Vergr. 49 000 x

Apikales Ende dreier Zellen des Riechepithels. Verbindungskomplexe zwischen Rezeptorzelle (**R**) und Stützzelle (**S**) bzw. zwischen zwei benachbarten Stützzellen. Zonula occludens (←), Desmosom (→), Filamentbündel (↓).

3.2.1.2.2. Peripherer Neurit und Perikaryon

Im peripheren Neuritenschnitt liegen zahlreiche in Längsrichtung verlaufende Neurotubuli, viele Mitochondrien und z.T. multivesikuläre Körper bis zu einem Durchmesser von $0,8\ \mu\text{m}$ (Vesikelgröße ca. $45\ \text{nm}$), während lamellär geschichtetes glattes Endoplasmatisches Retikulum und der Golgi-Apparat auf den supranukleären Zellbereich beschränkt sind.

Der Nucleus der Riechzelle ist überwiegend euchromatisch, i.d.R. mit 1-2 deutlichen Nucleoli ausgestattet. Mit Ausnahme des distalen Poles wird er nur von einem schmalen Zytoplasma-saum umgeben.

3.2.1.2.3. Zentraler Neurit der Rezeptorzelle (=Axon)

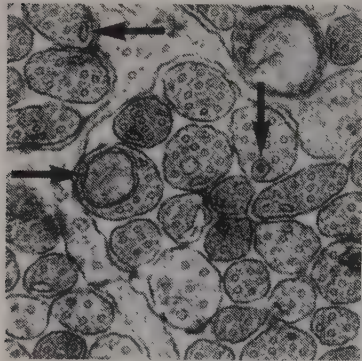
Je ein Axon entspringt am proximalen Pol jedes Sinneszell-perikaryons und verläuft zentripetal, zunächst in Zytoplasmaeinbuchtungen benachbarter Stütz- und Basalzellen. Bereits intraepithelial bilden sich Nervenfaserbündel aus mehreren Axonen, die gemeinsam durch die Basalmembran treten (Abb. 2) und in der Lamina propria und durchs Siebbeinlabyrinth zum Bulbus olfactorius verlaufen.

Die Mehrzahl der Axone besitzt einen runden Querschnitt, dessen Durchmesser bei über der Hälfte aller Nervenfasern zwischen $0,15$ und $0,25\ \mu\text{m}$ liegt (vereinzelt bis $0,5\ \mu\text{m}$). Im Verlauf der Axone fallen Verdickungen auf, bedingt durch das Auftreten von Mitochondrien (In einem Axonquerschnitt wurden sieben Mitochondrien gezählt.) (Abb. 13).

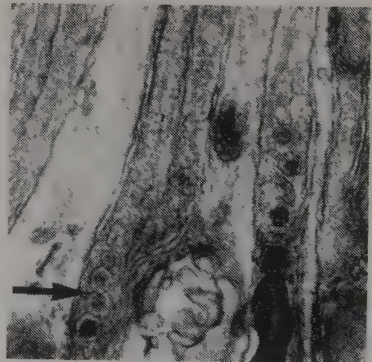
Unabhängig vom Axondurchmesser variiert die Elektronendichte des Axoplasmas: Es lassen sich sehr helle, elektronendurchlässige bis ausgeprägt elektronendichte, dunkle Axone erkennen (Abb. 5 und 13). Die Axone enthalten längsorientierte Neurotubuli mit einem Außendurchmesser von ca. $20\ \text{nm}$, die

teilweise leer sind, teilweise im Zentrum elektronendichtes Material zu enthalten scheinen. I.d.R. verlaufen in jedem Axon zwischen zwei und zehn Mikrotubuli, wobei helle Nervenfasern regelmäßig weniger besitzen als dunkle.

In einigen Axonen in eindeutig als olfaktorisch zu identifizierenden Nerven treten "dense core vesicles" vom Typ der neurosekretorischen Granula mit einem Durchmesser zwischen 50 und 90 nm auf (Abb.5 und 6).



5



6

Abb. 5: TEM-Nr. 750/15/4/2
Schäferhund-Mischling, 5 Jahre, ml
Vergr. 49 000 x

Ausschnitt aus einem quergeschnittenen olfaktorischen Nervenbündel. Hüllzellfortsätze mit Filamenten und Tubuli umschließen Axonbündel. Die runden bis ovalen Axonquerschnitte enthalten unterschiedlich elektronendichtes Axoplasma und eine unterschiedliche Anzahl von Neurotubuli. In den Axonen sind "dense core vesicles" (↓), Mitochondrien (→) und glattes Endoplasmatisches Retikulum (←) zu erkennen.

Abb. 6: TEM-Nr. 719/4/1/5
Schäferhund-Mischling, 4-5 Jahre, wbl
Vergr. 51 000 x

Ausschnitt aus einem längsgeschnittenen Axonbündel der Lamina propria. "Dense core vesicles" (→).

3.2.1.2.4. Axonsonderformen

Neben Axonen mit kreisrundem Querschnitt treten eigentümliche Nervenfaserformen auf, die nicht durch schräge Schnittführung bedingt sind, sondern zweifelsfrei reine Axonquerschnitte darstellen, da sich die Mikrotubuli kreisrund abbilden, was nur bei idealem Querschnitt der Tubuli und somit der Nerven-faser der Fall ist.

Die einfachste dieser Formen ist ein runder Querschnitt mit einem unterschiedlich langen, zungenförmigen, seitlichen Fortsatz. Je zwei runde bis ovale Querschnitte (mit Tubuli im Inneren), verbunden über eine schmale, ca. 20 nm breite Axoplasma-Brücke bilden hantelförmige Strukturen, die häufig lamellär aneinandergelagert sind. Weiterhin finden sich zum Kreis geschlossene Axonfortsätze, die an einer Stelle noch den runden bis ovalen Querschnitt (mit Tubuli) zeigen oder nur dünne (ca. 20 nm dicke) ringförmige Strukturen bilden. Diese Ringe umgeben einen Zytoplasmabereich, der in Elektrodendichte und Organellenbesatz dem Zytoplasma der Hüllzelle entspricht. In vielen Fällen sind mehrere dieser Ringe konzentrisch geschichtet und stehen in direktem Kontakt miteinander oder sind durch Zytoplasmabereiche getrennt. Die dünnen axonalen Ausläufer besitzen keine Tubuli (Abb. 7, 8, 9 und 10).

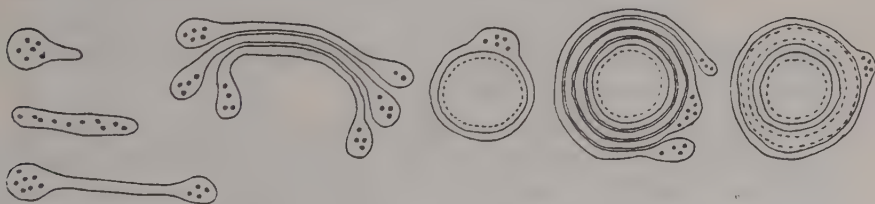


Abb. 7: Schematische Darstellung axonaler Sonderformen in der olfaktorischen Schleimhaut des Hundes. Gestrichelte Linien umgeben Hüllzellzytoplasma; benachbarte Axone oder Hüllzellbereiche wurden weggelassen; Neurotubulusquerschnitte (*•••).

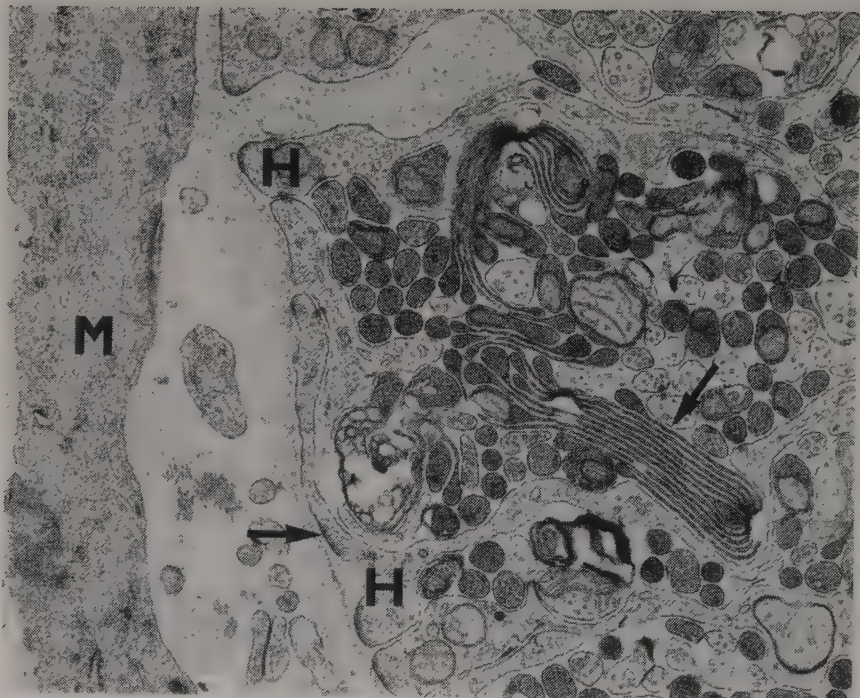


Abb. 8: TEM-Nr. 710/8/17
 Deutscher Schäferhund, 2-3 Jahre, wbl
 Vergr. 24 000 x

Randbereich eines olfaktorischen Nervenbündels unmittelbar unter dem Riechepithel, Querschnitt.

Das Axonbündel enthält überwiegend lamellär geschichtete, mit einem langen, dünnen Ausläufer versehene Nervenfaserverquerschnitte (). Hüllzellfortsätze (**H**), die die Axone umfassen, sind über Hemidesmosomen () mit der Basalmembran verbunden, die die einzelne Hüllzelle umgibt. In der linken Bildhälfte liegt eine glatte Muskelzelle (**M**), deren Zytoplasma dicht mit Myofilamenten gefüllt ist. Zwischen Muskelzelle und Nervenbündel, das hier noch kein Perineurium besitzt, liegen Kollagen- und Elastinfasern.



Abb. 9: TEM-Nr. 750/15/4/3
 Schäferhund-Mischling, 5 Jahre, ml
 Vergr. 49 000 x

Ausschnitt aus einem olfaktorischen Axonbündel, Querschnitt. Sieben konzentrisch geschichtete, zum Kreis geschlossene, axonale Ausläufer werden halbkreisförmig von vier weiteren Axonstrukturen mit ovalen Endigungen (mit Tubulusquerschnitten im Inneren) umfaßt. Der innerste Kreis umschließt sequestriertes Hüllzellzytoplasma (H).

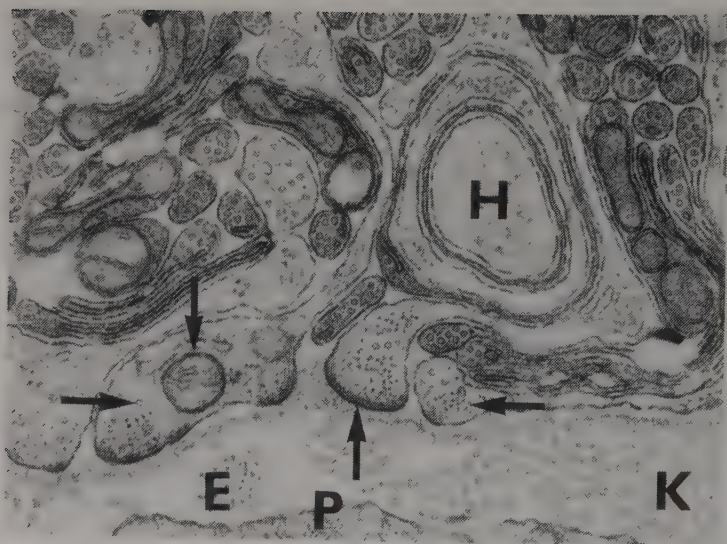


Abb. 10: TEM-Nr. 750/15/13/2
Schäferhund-Mischling, 5 Jahre, ml
Vergr. 49 000 x

Randbereich eines Riechnervenbündels, Querschnitt.

Zwei konzentrische, kreisförmige Axonstrukturen werden durch Hüllzellzytoplasma voneinander getrennt; im Zentrum liegt ebenfalls Plasma der Hüllzelle (**H**). Vor allem in den Randgebieten der Hüllzelle lassen sich quergeschnittene Filamente ($\leftarrow$) und Tubuli ($\rightarrow$) erkennen. Zahlreiche Hemidesmosomen ($\uparrow$) fixieren die Basalmembran an den Hüllzellfortsätzen. Sowohl in diesen Fortsätzen als auch in den Nervenfasern liegen Mitochondrien ($\downarrow$). Außerhalb der Basalmembran verlaufen Kollagen- (**K**) und Elastinfasern (**E**). Am unteren Bildrand ist der Ausschnitt einer durch pinozytische Vesikel charakterisierten Perineuralzelle zu sehen (**P**).

Schnittserien zeigen den Ursprung derartiger Strukturen: "Axonringe" entstehen durch seitliches Ausziehen der Axonzylinder zu Ausläufern mit einer Dicke von ca. 20 nm, die sich zum Hohlzylinder schließen und so entweder einen sequestrierten Zytoplasmabereich oder ein anderes dieser "Axonrohre" umschließen. Dabei spaltet sich bei den innen liegenden "Rohren" das Ursprungssaxon (mit einem runden Querschnitt) ab und verläuft schließlich ohne elektronenoptisch erkennbarer Beziehung zu den röhrenförmigen Strukturen. Die Hohlzylinder enden abrupt: Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen nurmehr wolkige Verdichtungen im Hüllzellzytoplasma erkennen, während die abgespaltenen Nervenfasern weiter zu verfolgen sind (Abb. 11).

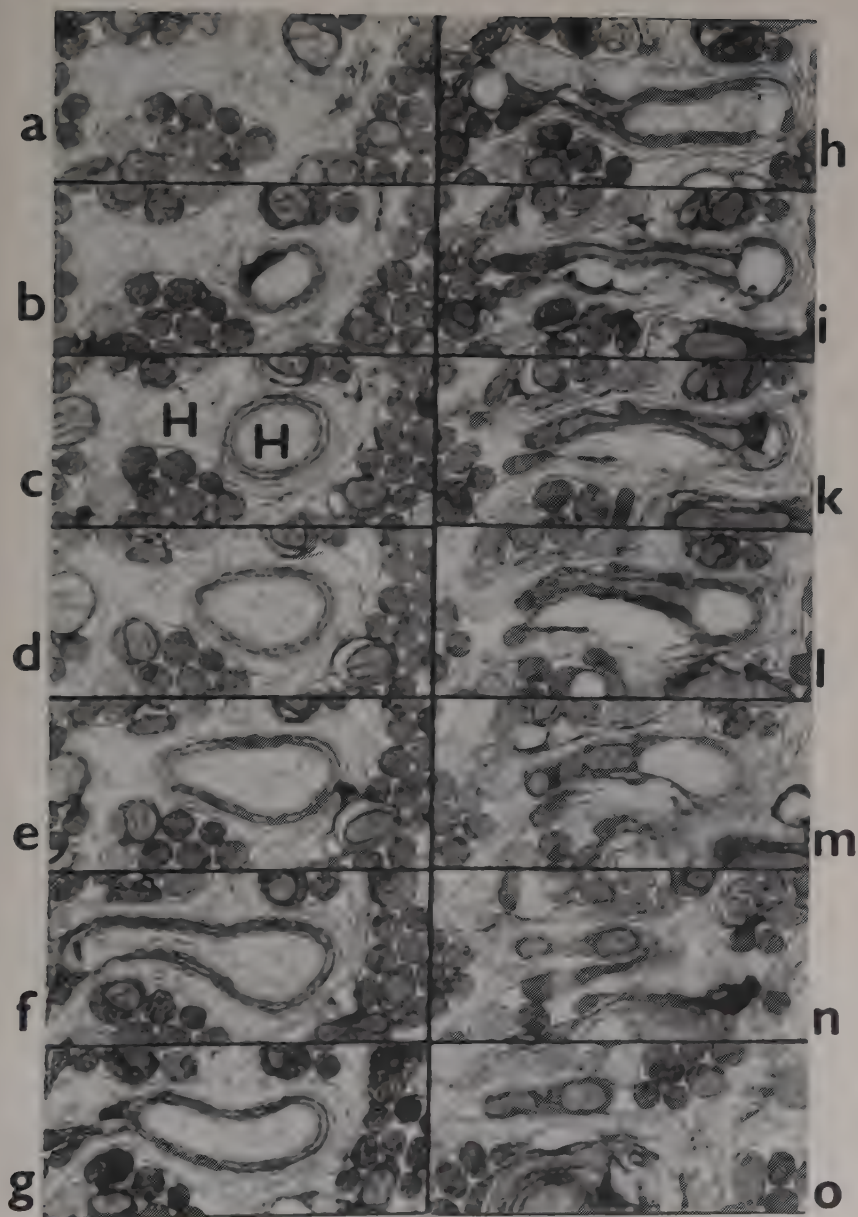
Leider läßt sich aus methodischen Gründen nicht bestimmen, ob diese Strukturänderungen in der Axonwachstumsrichtung, d.h. zentripetal, in der beschriebenen Reihenfolge ablaufen oder in umgekehrter Reihenfolge. Im zweiten Fall würde ein Hohlzylinder mit einem bis dahin unabhängigen Axon verschmelzen, sich an einer Stelle öffnen und unter fortschreitender Erweiterung und Verkleinerung des Längsdurchmessers würde ein Axon mit einem runden Querschnitt entstehen (Abb 11 und 12).

Abb. 11: TEM-Nr. 750/15/23/1 bis 750/15/47/1
 Schäferhund-Mischling, 5 Jahre, ml
 Vergr. 26 000 x

Serienschnitte eines olfaktorischen Nervenbündels,
 Querschnitte.

Die Serienschrittebenen **a** bis **o** umfassen eine Nervenbündel-
 strecke von ca. 2 μ m Länge. Hüllzellzytoplasma (**H**).

Ebene **a** läßt keine ungewöhnlichen Axonformen erkennen. In
 Ebene **b** fallen innerhalb des Hüllzellzytoplasmas unklar be-
 grenzte, runde Verdichtungen auf, die sich zu zwei konzen-
 trischen Kreisen, welche ein Hüllzellareal umschließen, ent-
 wickeln (Ebene **c**). Die ringförmigen Elemente werden zusehens
 längsoval bis schließlich der äußere der beiden Kreise mit
 einem vorher unabhängigen Axonquerschnitt Verbindung auf-
 nimmt, während der innere Ring keinen Zusammenhang mit einem
 Axon erkennen läßt (Ebenen **d** bis **f**). Der äußere Kreis öffnet
 sich an der Stelle, an der das ursprünglich unabhängige Axon
 mit der ringförmigen Struktur verschmolzen ist, und der
 innere Ring verbindet sich mit der zweiten gekennzeichneten
 Nervenfasern (Ebenen **g** und **h**). Das bisher von beiden
 Strukturen umschlossene Hüllzellzytoplasma verschwindet aus
 der Schnittebene; es entsteht ein langgestreckter Nervenfa-
 serquerschnitt (mit einem Mitochondrium im Inneren), der zu
 drei Viertel von der zweiten dünn ausgezogenen, axonalen
 Struktur umfaßt wird (Ebene **i**). Der äußere Axonquerschnitt
 nimmt in seiner Verlaufsrichtung an Länge ab
 (Ebenen **k** bis **n**), bis schließlich wieder zwei voneinander
 durch einen Hüllzellfortsatz getrennte runde bzw. ovale (mit
 Mitochondrien) Axonquerschnitte entstehen (Ebene **o**).



Axon 1 Axon 2

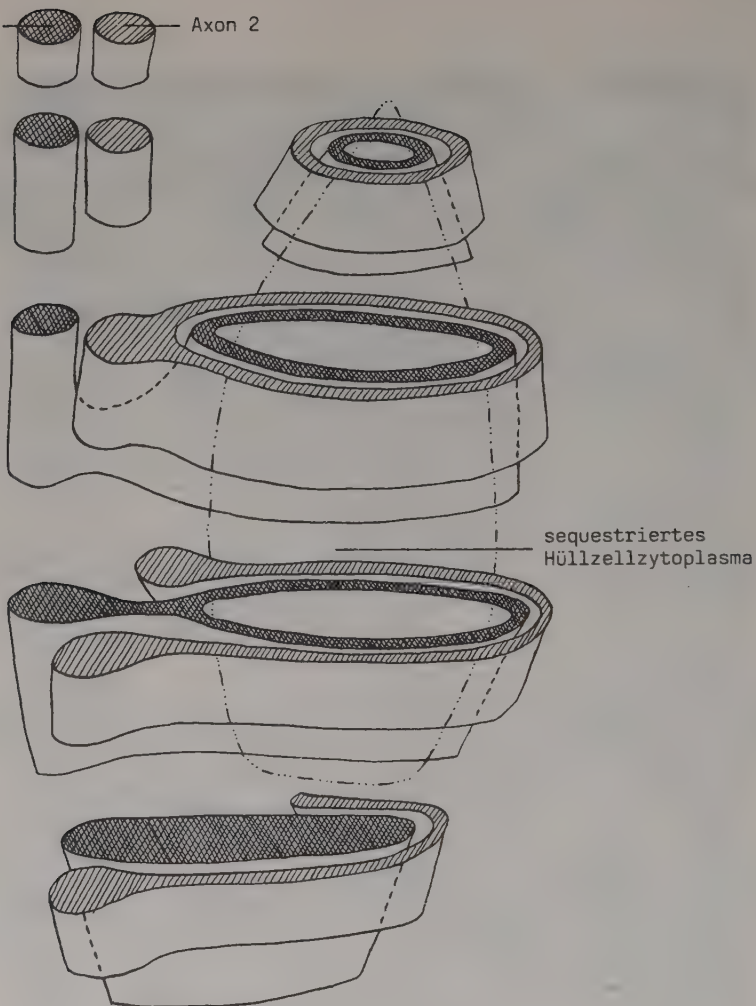
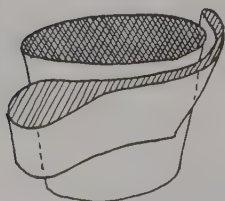
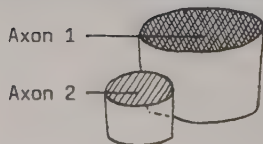


Abb. 12:



Vereinfachte Darstellung der
morphologischen Variationen,
wie sie durch Abb. 11 doku-
mentiert sind.
Umgebende Strukturen wurden
weggelassen.



3.2.1.3. Hüllzelle der Fila olfactoria

Die olfaktorischen Axone werden unmittelbar nach ihrem Austritt aus dem Epithel von speziellen Hüllzellen umfaßt. Dabei umhüllt jede dieser Zellen eine große Anzahl von Nervenfasern, die als unterschiedlich große Bündel in Zytoplasmaeinfaltungen verlaufen. Innerhalb der Bündel liegen die Axone dicht gepackt beieinander, jedoch ohne Zellmembrankontakte vom Typ "junction" oder "Desmosom" auszubilden.

3.2.1.3.1. Innenstruktur der Hüllzelle

Der feingranulierte, überwiegend euchromatische Nucleus der Hüllzelle paßt sich mit seiner im Nervenverlauf langgestreckten Form der Zellform an und ist meist randständig. In Kernnähe liegt ein größeres Areal des relativ elektronendurchlässigen Zytoplasmas, das den Großteil der Organellen enthält. Mitochondrien, Golgi-Apparat, rauhes und glattes Endoplasmatisches Retikulum sowie freie Ribosomen sind zu erkennen. In vielen Zellen liegen unterschiedlich große und elektronendichte Lipofuszingranula (Abb. 13 und 19). Auffallend ist der Gehalt der Zelle an Filamenten mit einem Durchmesser von ca. 6 nm und Mikrotubuli mit einem Durchmesser von ca. 20 nm, die in Axonlängsrichtung verlaufen und besonders zahlreich in den Randbezirken der Zelle auftreten (Abb. 10 und 23).

Dünne Zytoplasmaausläufer bilden die "Taschen" für die Axonbündel und umschließen diese vollständig, so daß i.d.R. keine Nervenfasern die Basalmembran der Hüllzelle berührt. Diese Basalmembran umgibt jede einzelne Hüllzelle innerhalb eines Nervenbündels, das i.d.R. aus mehreren Hüllzeleinheiten besteht (Abb. 13 und 19). Teilweise sind die Basalmembranen zweier Zellen über Verzweigungen der Membran miteinander verbunden. Zahlreiche Hemidesmosomen mit ausgeprägten Zytoplasmaverdichtungen fixieren die Basalmembran an der Hüllzelle (Abb. 10 und 23).

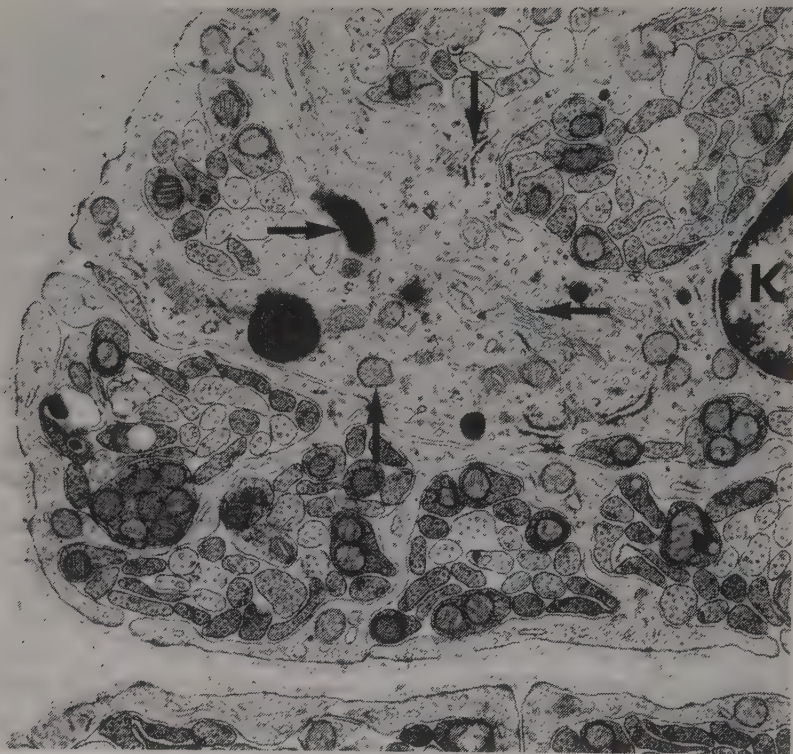


Abb. 13: TEM-Nr. 710/8/5
 Deutscher Schäferhund, 2-3 Jahre, wbl
 Vergr. 24 000 x

Querschnitt durch zwei Hüllzelleinheiten eines olfaktorischen Nervenbündels.

Jede Hüllzelle wird von einer Basalmembran umgeben, die durch Hemidesmosomen fixiert ist. In Zellkern (K)-Nähe liegt ein größerer Zytoplasmabereich mit zahlreichen Organellen: Golgi-Apparat (←), rauhes (↓) und glattes Endoplasmatisches Retikulum, freie Ribosomen, Mitochondrien (↑) sowie Lipofuszingranula (→).

Die Axone enthalten neben Neurotubuli häufig in Längsrichtung der Nervenfasern orientierte Mitochondrien, teilweise auch nebeneinander liegend.

3.2.1.3.2. Zellverbindungen innerhalb einer Hüllzelleinheit

Spezielle Verbindungen zwischen Hüllzellfortsätzen treten nicht regelmäßig auf. Fast ausschließlich findet man sie im Randbereich der Zellen, wo sie die Enden der Zytoplasmaausläufer aneinander heften und so die "Axontaschen" von der Umgebung abschließen. An diesen Stellen lassen sich Zonulae occludentes (Tight junctions) und Desmosomen unterscheiden (Abb. 15 a und b). In wenigen Fällen verbinden desmosomale Komplexe die Zellfortsätze im Inneren der Hüllzelleinheit.

Noch seltener können Strukturen zwischen Axonquerschnitten und Hüllzelle beobachtet werden, die desmosomalen Verbindungen sehr ähnlich sehen. Es läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß es sich hierbei um artefizielle (evtl. präparationsbedingte) Veränderungen handelt, wofür auch das nur vereinzelte Vorkommen sprechen würde.

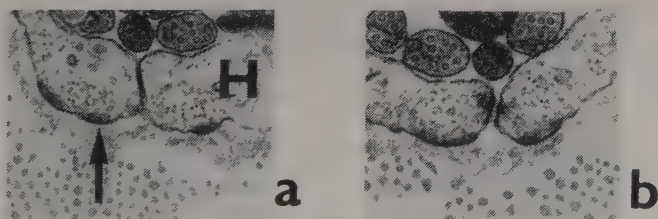


Abb. 15 a: TEM-Nr. 750/15/13/1

Abb. 15 b: TEM-Nr. 750/15/20/1

Schäferhund-Mischling, 5 Jahre, ml

Vergr. 44 000 x

Ausschnitte aus den Randbereichen eines olfaktorischen Nervenbündels, Querschnitte.

Zwei Hüllzellfortsätze (**H**) umgreifen ein Axonbündel und bilden an ihrer Schlußstelle eine Zonula occludens (Abb. 15 a) bzw. ein Desmosom (Abb. 15 b) aus. Die Basalmembranen sind durch Hemidesmosomen (**↑**) an der Hüllzelle fixiert.

3.2.1.4. Nervenbündel der olfaktorischen Schleimhaut

Olfaktorische Nervenbündel umfassen zwischen einer und mehreren (bis zu wenigstens 12) Hüllzelleinheiten, wobei unabhängig von der Lage innerhalb der Lamina propria Axone in unterschiedlicher Zahl bis zu ca. 1500 (nach eigenen Zählungen) in den Zytoplasmaeinfaltungen einer einzigen Hüllzelle verlaufen. Auch "leere" Zellen, d.h. ohne Axonquerschnitte, treten auf.

Alle Nervenbündel, die aus drei oder mehr Hüllzellen bestehen, wird von einem Perineurium umgeben, das aus einer unterschiedlich großen Zahl von Perineuralzellen aufgebaut ist (Abb. 17). Um einen Teil der kleinen, aus ein oder zwei Hüllzelleinheiten bestehenden Bündel, die keine Nervenscheide besitzen, legen sich Fibrozyten, ohne jedoch eine zusammenhängende Umhüllung zu bilden (Abb. 16).

Der Umfang der Nervenbündel (d.h. die Zahl der Hüllzelleinheiten pro Nervenbündel) nimmt i.d.R. mit zunehmendem Abstand vom Epithel zu.

Abb. 16: Schematische Darstellung eines olfaktorischen Nervenbündels, das dicht unterhalb des Riechepithels liegt, Querschnitt. Das Bündel besteht aus zwei Hüllzelleinheiten ohne Perineurium.

Abb. 17: Schematische Darstellung eines olfaktorischen Nervenbündelquerschnitts, bestehend aus 12 Hüllzelleinheiten. Das tief unter dem Riechepithel liegende Bündel wird von einem Perineurium und epineuralen Fibrozyten umgeben.

H	Hüllzelleinheit		Kollagenfasern
P	Perineurium		Elastinfasern
F	Fibrozyten		Desmosomen
----	Basalmembran		Hemidesmosomen



16



17

3.2.1.4.1. Innerer Aufbau olfaktorischer Nervenbündel

Innerhalb eines Perineuriums sind die Hüllzelleinheiten von Kollagen- und Elastinfasern umsäumt. Die Kollagenfasern (Durchmesser ca. 50 nm) in diesem Endoneurium zeigen charakteristische Querstreifung und eine ausschließlich in Längsrichtung der Axone orientierte, parallele Anordnung. Bindegewebsfasern finden sich nie innerhalb der Basalmembran, die die Hüllzellen umgrenzt, sondern stets außerhalb.

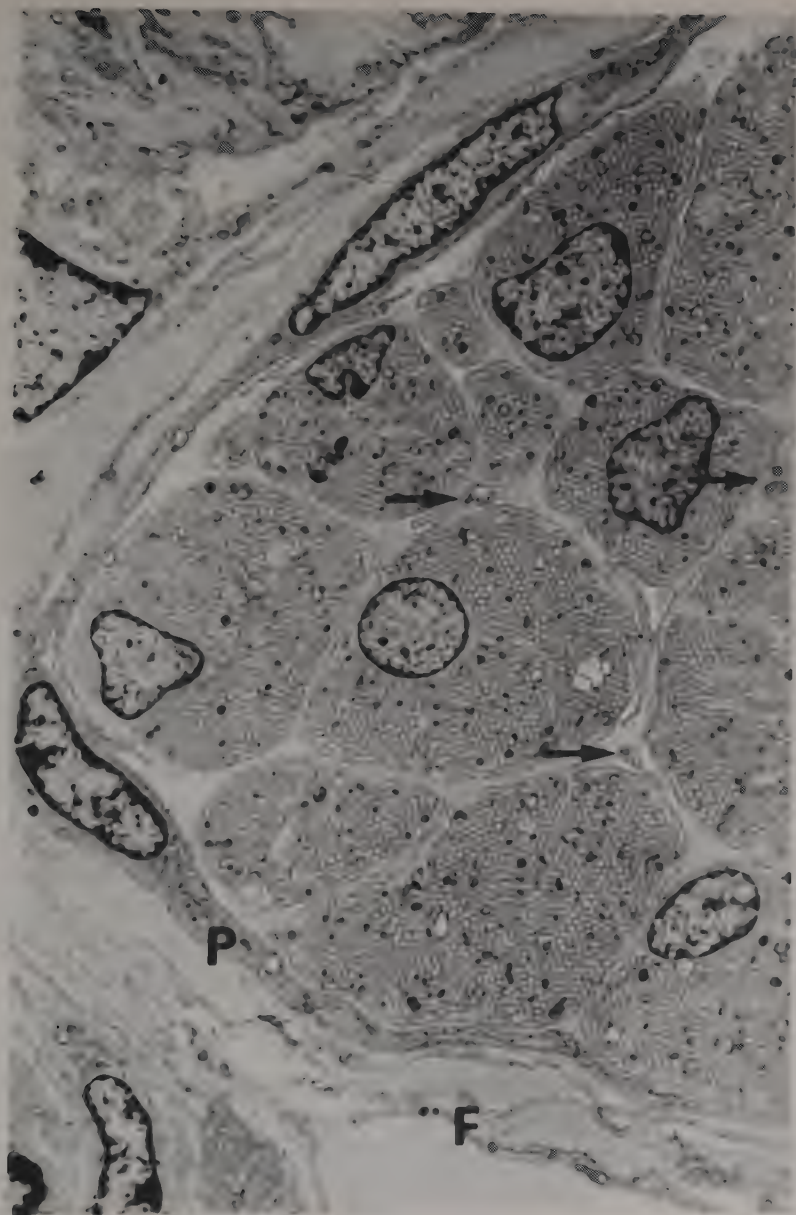
Auch Fibrozyten mit ihrer typischen elektronenmikroskopischen Morphologie sind im Endoneurium zu beobachten: Die langgestreckten Zellen mit spärlich ausgebildetem, rauhem Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Feld sowie nur wenigen Mitochondrien schieben ihre Fortsätze zwischen die Hüllzellen (Abb. 18). Die endoneuralen Fibrozyten besitzen im Gegensatz zu den Hüllzellen keine Basalmembran.

In diesem endoneuralen Bindegewebe verlaufen Blutgefäße.

Abb. 18: TEM-Nr. 702/36/2
 Dalmatiner, 3 Monate, ml
 Vergr. 5 300 x

Großes olfaktorisches Nervenbündel, Querschnitt, tief unterhalb des Riechepithels gelegen.

Zwischen den einzelnen Hüllzelleinheiten (mit Nucleus, Zytoplasmaausläufern und Axonbündel) liegen Fibrozytenfortsätze (→) und Bindegewebsfasern. Das Nervenbündel wird von einem ausgeprägten Perineurium (**P**) und epineuralen Fibrozyten (**F**) umhüllt.



3.2.1.4.2. Peri- und Epineurium

Das Perineurium setzt sich aus den Perineuralzellen, dicht gelagerten, parallel zu Nervenverlauf angeordnete Kollagenfasern und kleinen Arealen mit Elastinfasern zusammen (Abb. 19 und 20).

Ein auffallendes Charakteristikum der einzelnen Perineuralzelle stellt die Vielzahl ca. 65-80 nm großer, pinocytotischer Vesikel dar, die in der Mehrzahl mit der Zellmembran und häufig auch mit dem Extrazellularraum in Verbindung stehen. Das zweite ins Auge fallende Merkmal stellen filamentäre Strukturen dar, die das gesamte Zytoplasma durchziehen und auf Nervenquerschnitten sowohl quer- als auch längsgeschnitten erscheinen. Vereinzelt lassen sich auch tubuläre Elemente erkennen. Daneben enthalten die Zellen spärlich rauhes Endoplasmatisches Retikulum und relativ wenige Mitochondrien (Abb. 20). Der überwiegend heterochromatische Nucleus ist sehr flach und längsoval (Abb. 19, 20 und 23).

Die Ausläufer der Perineuralzellen sind paarweise von Basalmembranen umgeben, die über Hemidesmosomen mit den Zellen verbunden sind. Die Plasmamembranen eines Zellpaares bilden untereinander desmosomale Komplexe aus (Abb. 20). Eine Perineuralzelle ist i.d.R. nicht über ihre gesamte Ausdehnung mit derselben Zelle paarweise verbunden, sondern abschnittsweise mit verschiedenen Zellindividuen (Abb. 21). Mit dieser Überlappung der Zellfortsätze ist eine dichte, kontinuierliche Nervenhülle garantiert.

Jedes Perineurium umfaßt ein bis mehrere Zellpaare oder auch einzelne Zellen, zwischen deren Basalmembranen Kollagen- und Elastinfasern angeordnet sind. Die den Hüllzeleinheiten zugewandte Basalmembran ist entweder unvollständig ausgebildet oder fehlt ganz.

Den Übergang zum umgebenden, lockeren Bindegewebe der Lamina propria stellen Lagen einzelner, flacher, epineuraler Fibrozyten dar, die keine Basalmembran besitzen. Zwischen diesen Zellen sind die Bindegewebsfasern zunehmend lockerer gelagert (Abb. 19, 20, 21).

Abb. 19: TEM-Nr. 711/2/1
Irischer Wolfshund-Mischling, 1 Jahr, ml
Vergr. ? 500 x

Olfaktorisches Nervenbündel, Querschnitt.

Drei Hüllzelleinheiten, jeweils umgeben von ihrer Basalmembran, werden getrennt durch dicht gepackte, längsorientierte Bindegewebsfasern. In allen drei Hüllzellen liegen die Nuclei mit deutlichen Kernkörperchen und zahlreiche Lipofuszingranula in der Schnittebene. Das Nervenbündel wird umhüllt von einem Perineurium (**P**): Zwischen den Perineuralzellen verlaufen Kollagen- (←) und Elastinfasern (→).

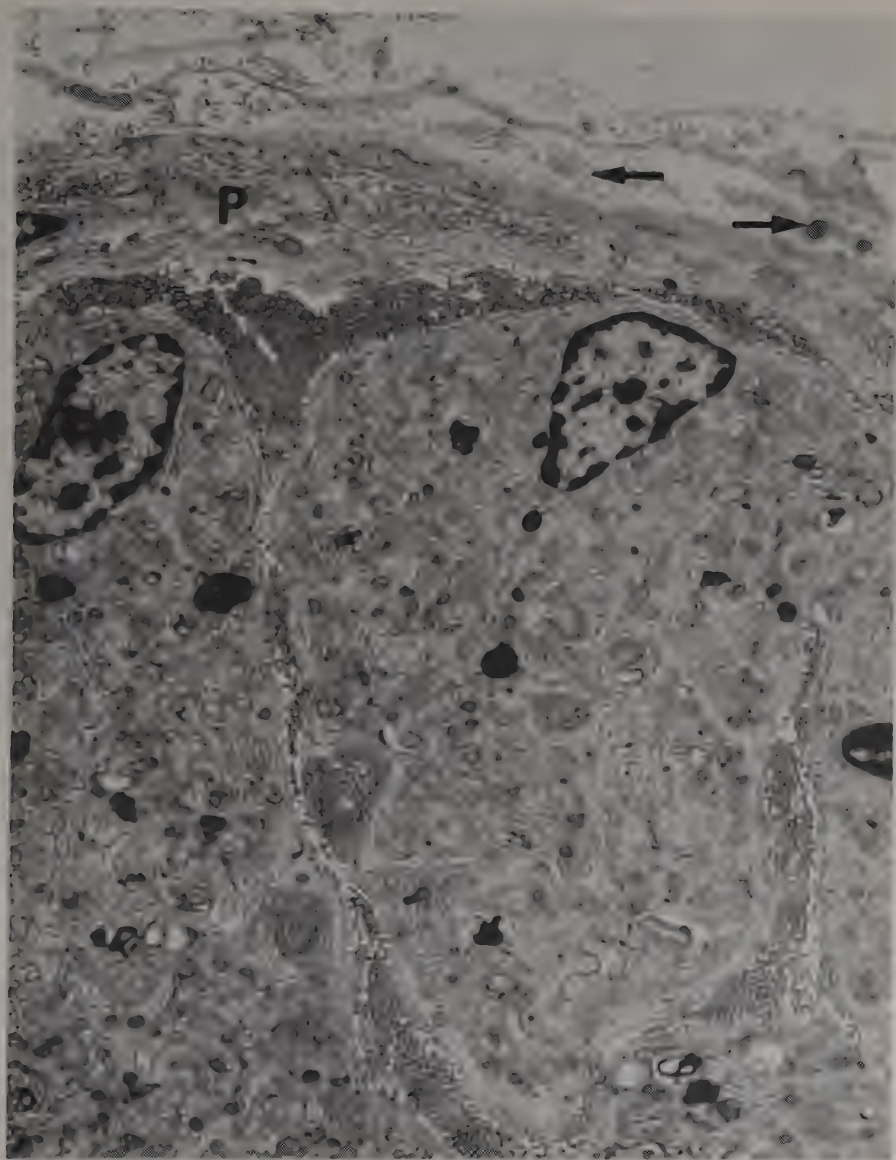


Abb. 20: TEM-Nr. 711/2/2
Irischer Wolfshund-Mischling, 1 Jahr, ml
Vergr. 28 000 x

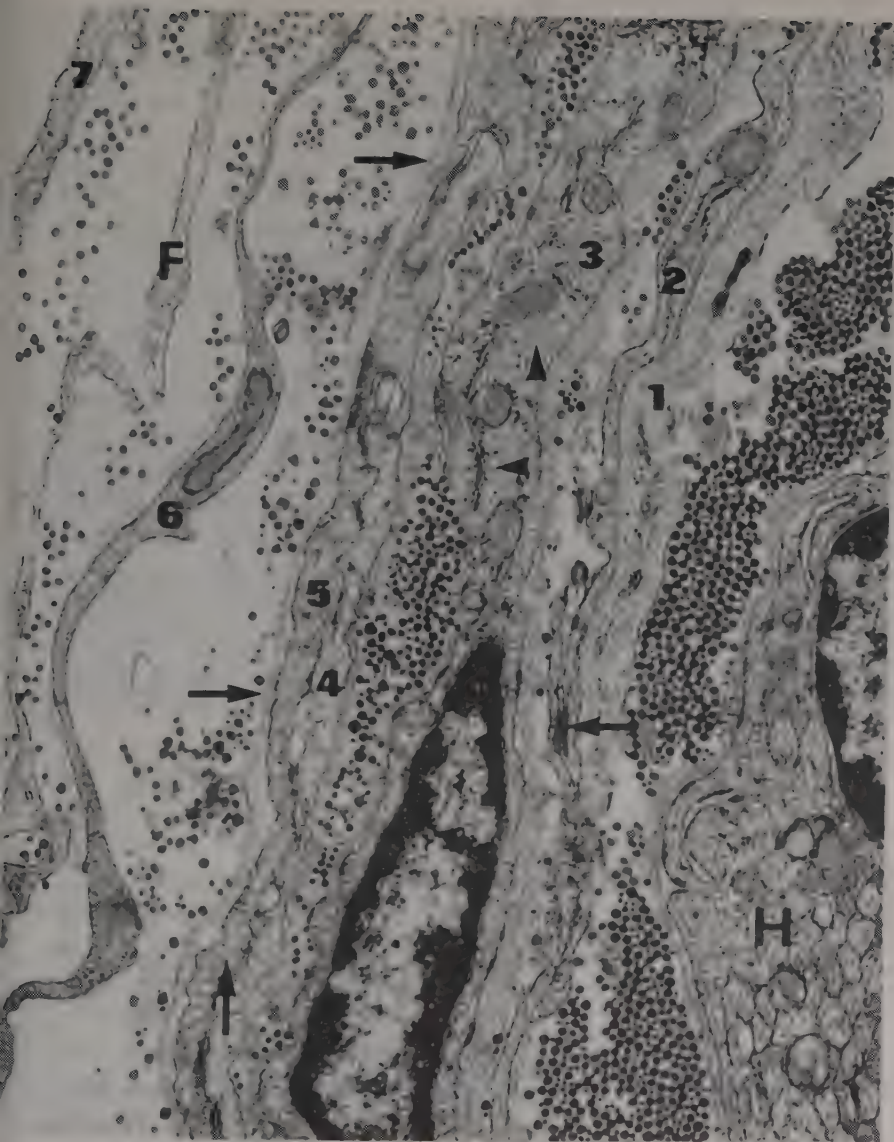
Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 19 links oben.

Perineurium, bestehend aus sieben Perineuralzellen (**1** bis **7**). Am rechten, unteren Bildrand liegt eine Hüllzelleinheit (**H**) mit Nucleus, Axonbündeln und Basalmembran. Zwischen dieser und der innersten Perineuralzelle (**1**), die keine deutliche, zum Nervenbündel hin gerichtete Basalmembran besitzt, verlaufen dicht gepackte Kollagen- und Elastinfasern.

Die Plasmamembranen der paarweise angeordneten Perineuralzellen (**1** und **2**; **4** und **5**) trennt nur ein schmaler Interzellularspalt, der stellenweise durch Desmosomenkomplexe ($\leftarrow$) überbrückt wird. Basalmembranen ($\rightarrow$) umschließen die Zellpaare bzw. die einzeln verlaufenden Perineuralzellen und sind über Hemidesmosomen an den Zellen fixiert.

Der Peripherie zu lockert sich die Anordnung der Bindegewebsfasern auf, und die äußeren Perineuralzellen (**6**; **7**) besitzen nur mehr unvollständige Basalmembranen. Zwischen diesen beiden Zellen verlaufen Fortsätze von Fibrozyten (**F**), die als epineurales Äquivalent angesehen werden können.

Als Besonderheit enthalten Perineuralzellen eine große Zahl pinozytotischer Vesikel ($\uparrow$) sowie quer- und längsorientierte Mikrofilamente ($\blacktriangle$) und -tubuli ($\blacktriangleleft$).



3.2.1.4.3. Nervenbündeltypen

Neben Unterschieden bezüglich Umhüllung und Größe unterscheiden sich die Nervenbündel der Riechschleimhaut durch die Struktur der Axonquerschnitte.

Abb. 18 zeigt ein Bündel, in dessen Hüllzellen die dicht gelagerten Axone kreisrunde Querschnitte aufweisen. Nur wenig Hüllzellzytoplasma läßt sich in Form von schmalen Fortsätzen erkennen. Diese Art der Nervenbündel überwiegt in der olfaktorischen Schleimhaut.

Davon abweichende Morphologie betrifft i.d.R. das gesamte Bündel, nicht nur isolierte Hüllzeleinheiten.

Ein Teil der Nervenbündel fällt durch elektronendurchlässige, große, runde Profile auf, die teilweise ineinander übergehen, wobei sich die begrenzenden Plasmamembranen aufzulösen scheinen. Diese Zellbereiche machen einen geschwollenen Eindruck und enthalten keine oder nur sehr wenige Mikrotubuli. Insgesamt besitzen derartige Hüllzeleinheiten relativ wenige Axone mit der typischen Morphologie (Abb. 21 und 22).

In eindeutig olfaktorischen Nervenbündeln kann man fast oder völlig "leere" Hüllzellen beobachten, in denen Zytoplasmafortsätze ohne Axonquerschnitte das Bild beherrschen (Abb. 23). Aufgrund der umgebenden Basalmembran und der Hemidesmosomen, die die Basalmembran an der Plasmamembran fixieren, können auch "leere" Zellen elektronenoptisch zweifelsgewiss als Hüllzellen identifiziert werden.

Besonders augenfällig sind Bündel mit Axonsonderformen. Die Nervenfasern besitzen in diesem Nervenbündeltyp in der Mehrzahl eine von dem üblichen, runden Querschnitt abweichende Form.

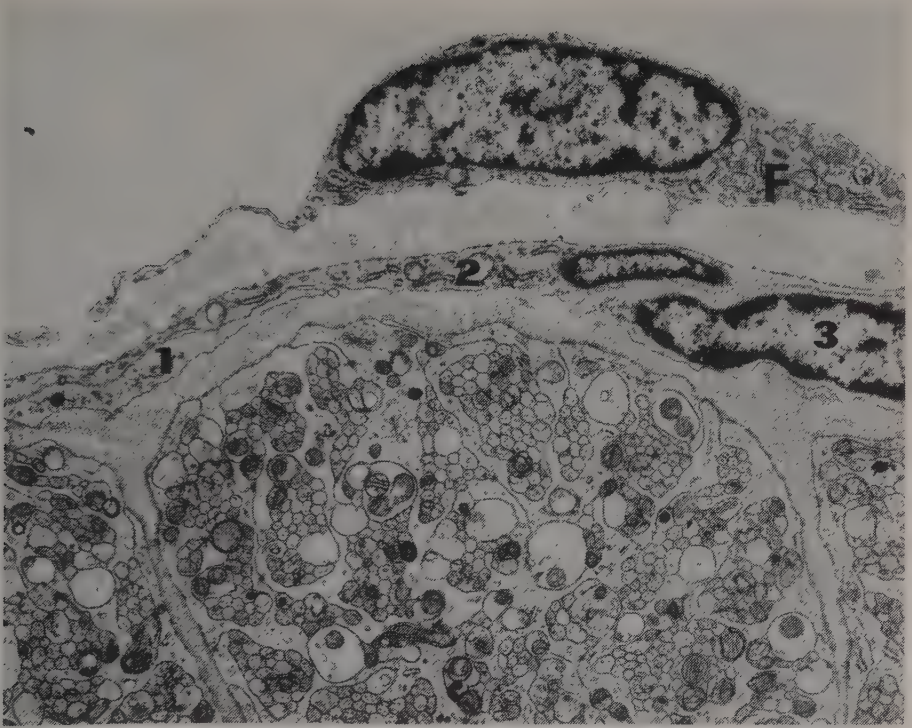


Abb. 21: TEM-Nr. 734/8/13
Beagle, 9 Jahre, wbl
Vergr. 10 000 x

Olfaktorischer Nervenbündelquerschnitt.

Die drei abgebildeten Hüllzeleinheiten besitzen im Vergleich zu Abb. 18 deutlich umfangreichere Zytoplasmaanteile. Große, runde Areale geringer Elektronendichte, die teilweise Mitochondrien enthalten, fallen auf (siehe auch Abb. 22).

Das Perineurium zeigt in dem abgebildeten Bereich drei Zellindividuen: Der äußeren Perineuralzelle (**2**) liegen in ihren beiden Hälften je eine weitere Perineuralzelle (**1** und **3**), welche sich gegenseitig nicht berühren, unmittelbar an. Die Außenseite der Zelle **2** wird von einer kontinuierlichen Basalmembran begleitet. Der Fibrozyt (**F**) gehört bereits zur epineuralen Umhüllung.

Abb. 22: TEM-Nr. 734/2/7
 Beagle, 9 Jahre, wbl
 Vergr. 21 000 x

Ausschnitt aus einem olfaktorischen Nervenbündelquerschnitt. Die Hüllzelleinheit enthält, analog zu Abb. 21, große, annähernd runde, elektronendurchlässige Profile, deren Membranen an vielen Stellen in Auflösung begriffen bzw. mit angrenzenden Plasmamembranen verschmolzen sind (↓). Derartige Bereiche enthalten teils intakte Mikrotubuli (←), wenn auch nur in geringer Zahl, teils größere, klare, vesikuläre Strukturen (→) in einem insgesamt gebläht erscheinenden Zytoplasma. Solche vesikulären Gebilde stehen vielerorts mit wurstförmigen, gewundenen und varikös verdickten Deformationen degenerierender Neurotubuli in direktem Zusammenhang. Neben unveränderten Axonen lassen sich zahlreiche Nervenfasern mit sehr hellem Axoplasma und wenigen Neurotubuli erkennen. Die Plasmamembranen dieser eindeutig axonalen Strukturen (↑) verschmelzen mit benachbarten Zellmembranen. Daneben scheinen degenerierte Axone partiell zu konfluieren und von der Hüllzelle phagozytiert zu werden. Hieraus wird deutlich, wie innerhalb der Fila olfactoria jeweils ein gewisses Kontingent von Axonen sich in verschiedenen Stadien der Degeneration und/oder Atrophie befindet.

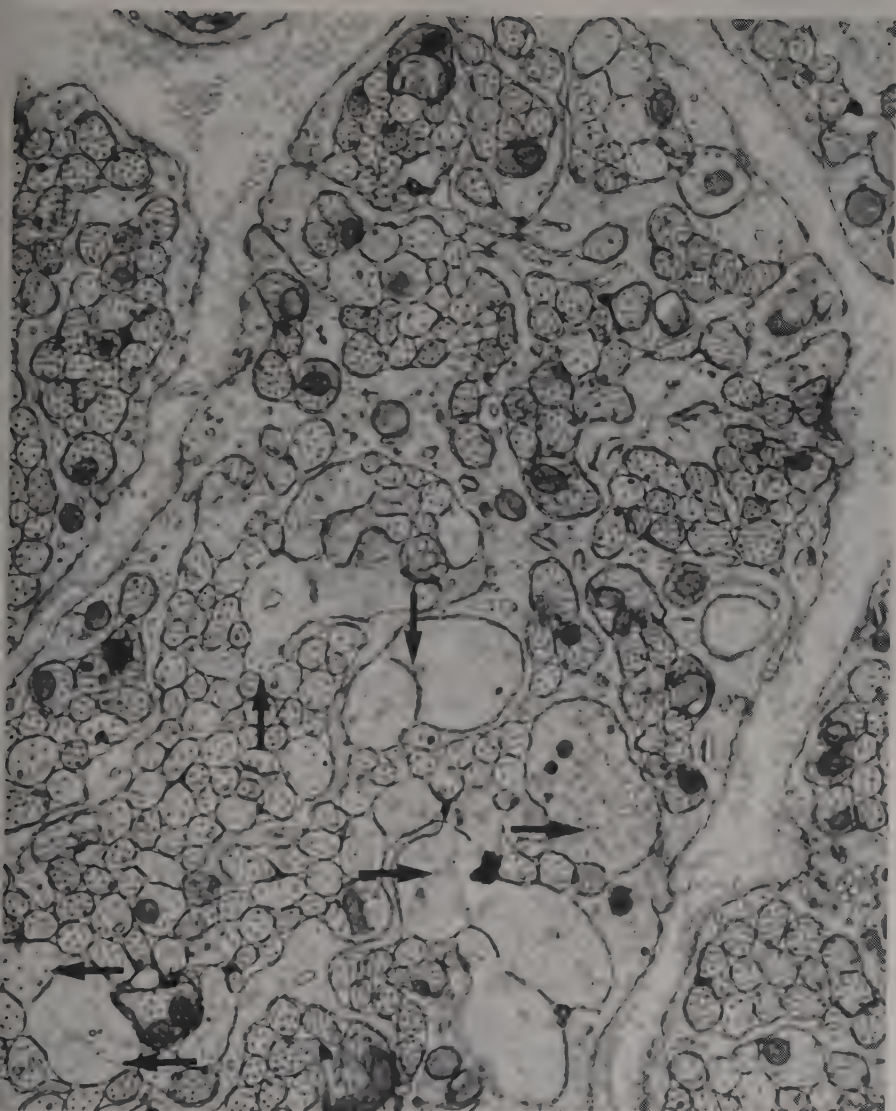




Abb. 23: TEM-Nr. 750/15/43/2
 Schäferhund-Mischling, 5 Jahre, ml
 Vergr. 31 000 x

Randbereich eines olfaktorischen Nervenbündels im Querschnitt mit einer Hüllzelle, die nur wenige Nervenfasern umschließt. Die zugehörige Basalmembran ist hemidesmosomal verankert. Vielfach berühren sich Hüllzellfortsätze über einen längeren Abschnitt ohne durch Axonquerschnitte getrennt zu sein (↓). Filamente (←) und Tubuli (→) verlaufen im Zytoplasma der Hüllzelle. Das Nervenbündel besitzt eine Umhüllung aus Perineuralzellen (**P**) und Bindegewebsfasern. Links oben schließt sich ein epineuraler Fibrozyt (**F**) ans Perineurium an.

Diese Unterschiede in der Morphologie der olfaktorischen Nervenbündel sind unabhängig von der Lage in der Lamina propria, der Größe und Umhüllung der Bündel.

Neben ausschließlich olfaktorischen Nervenbündeln treten in der Riechschleimhaut auch Bündel auf, die nichtolfaktorischen Ursprungs sind und Axone enthalten, die entweder mit einer Myelinscheide ausgestattet (Schwannzell-Typ) oder in Remakzellen eingebettet sind. Jede Remakzelle umhüllt mehrere Nervenfasern, die jedoch im Gegensatz zu Riechaxonen einzeln in Zytoplasmaeinbuchtungen liegen, ohne Kontakt untereinander.

Außerdem finden sich "gemischte" Nerven, in denen ein Bereich olfaktorische Nervenfasern enthält und ein i.d.R. kleineres Areal vegetative oder sensible Axone. Innerhalb dieser Bündel liegen die unterschiedlichen Hüllzellen nebeneinander, nur getrennt durch Bindegewebe und jeweils umgeben von einer Basalmembran. Eine gemeinsame Perineuralscheide bildet die Umhüllung.

3.2.2. Immunhistochemie der normalen Riechschleimhaut

3.2.2.1. NSE (=neuron-specific enolase)

Positive immunhistochemische Reaktion zeigen innerhalb der normalen Riechschleimhaut ausschließlich olfaktorische Sinneszellen: Intraepithelial lassen sich gefärbte Zellen mit Zellkernen im mittleren Drittel des Epithels, also in der Lage der Rezeptorzellnuclei erkennen (Abb. 24).

Perikaryon und Dendrit der Zellen sind NSE-positiv, während der Zellkern nicht mit dem Antiserum reagiert, und intraepithelial auch keine axonalen Fortsätze darzustellen sind. Jedoch färben sich nicht alle Riechzellen des olfaktorischen Epithels an; die Dichte der positiven Zellen schwankt stark. In Bereichen mit einer großen Anzahl positiver Epithelzellen liegen immer auch Zellen, die nach Lage und lichtmikroskopischer Morphologie als Sinneszellen identifiziert werden können und keine Bindung mit NSE-Antikörpern eingehen. In der Lamina propria verhalten sich die Nervenbündel NSE-positiv.

3.2.2.2. GFAP (=glial fibrillary acidic protein)

Im olfaktorischen Neuroepithel reagiert der apikale Zytoplasmasaum der Stützzellen schwach GFAP-positiv. Basales Stützzellzytoplasma und Stützzellkerne sind, wie alle übrigen zellulären Bestandteile des Epithels negativ.

In der Lamina propria färben sich die Nervenbündel intensiv an (Abb. 25). Semidünnschnitte, die mit GFAP-Antiserum behandelt wurden, zeigen, daß innerhalb dieser Bündel die Hüllzellnuclei und das Bindegewebe zwischen den Hüllzeleinheiten keine Reaktion eingehen. Das rote Reaktionsprodukt füllt auch nicht den gesamten, von einer Basalmembran umgebenen Bereich einer Hüllzeleinheit aus: Die Färbung ist marmoriert und erweckt so den Eindruck eines Nebeneinanders positiver und negativer Areale (Abb. 26).

Nicht alle Nervenbündel der Lamina propria sind GFAP-positiv; teilweise liegen stark gefärbte Bündel unmittelbar neben ungefärbten.

3.2.2.3. S 100 (=S 100-Protein)

Intraepithelial ist keine positive Reaktion mit S 100-Antiserum zu erkennen. In der Lamina propria verhalten sich die Nervenbündel S 100-positiv.

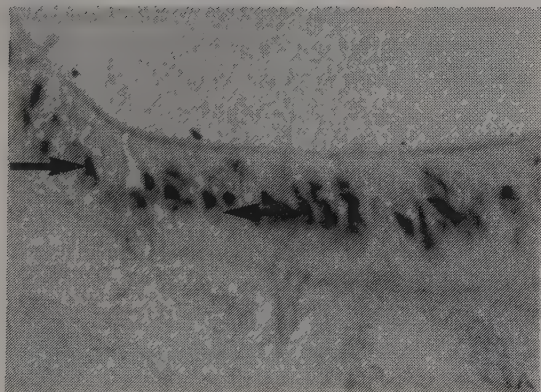
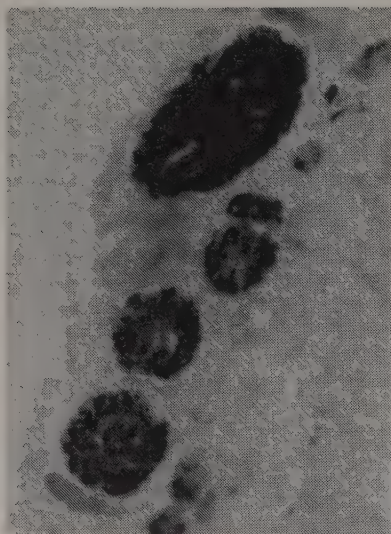


Abb. 24: Paraffinschnitt, mit NSE-Antiserum behandelt
Deutscher Schäferhund, 2-3 Jahre, wbl
TEM-Nr. 710
Vergr. 300 x

Olfaktorisches Epithel: Zahlreiche Zellen sind NSE-positiv. Gefärbt sind Perikaryon und Dendrit (➡), während der Zellkern (➡) keine Reaktion zeigt..



25



26

Abb. 25: Paraffinschnitt, mit GFAP-Antiserum behandelt
Beagle, 9 Jahre, wbl
TEM-Nr. 734
Vergr. 300 x

In der Lamina propria der Riechschleimhaut liegen Nervenbündelquerschnitte, die mit GFAP-Antikörpern reagieren.

Abb. 26: Semidünnschnitt, mit GFAP-Antiserum behandelt
Schäferhund-Mischling, 4-5 Jahre, wbl
TEM-Nr. 719
Vergr. 750 x

GFAP-positives Nervenbündel der olfaktorischen Schleimhaut. Der nur 2 μ m dicke Gewebeschnitt läßt die Innenstruktur der Nervenbündel erkennen:

Hüllzellkerne (↓) und endoneurales Bindegewebe (↑) zeigen keine Reaktion mit dem Antiserum, im Gegensatz zu den Hüllzeleinheiten (mit Ausnahme des Zellkerns).

3.2.3. Diskussion zu Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie der normalen Riechschleimhaut

Die Feinstruktur der olfaktorischen Schleimhaut des Hundes zeigt im Vergleich zur Riechschleimhaut anderer, bisher untersuchter, warmblütiger Wirbeltiere keine grundlegenden Unterschiede. Das Bauprinzip des Geruchsorgans scheint im Lauf der Phylogenese kaum Veränderungen unterworfen gewesen zu sein.

Innerhalb des olfaktorischen Epithels lassen die Riechzellen des Hundes keinerlei morphologische Besonderheiten erkennen, mit Ausnahme des offensichtlich regelmäßigen Auftretens ausgeprägter Wurzelfüßchen am Ursprung der Cilien. OKANO et al. (111) beobachteten nämlich diese beim Hund nur inkonstant.

Wie erwartet enthalten die olfaktorischen Sinneszellen des Hundes wie auch die Riechzellen menschlicher Feten (136) als neuronale Zellen NSE (=neuron-specific enolase). Die Tatsache, daß bei weitem nicht alle lichtmikroskopisch (aufgrund Zellage und -form) als Rezeptorzellen identifizierten Zellen NSE-positiv reagieren, spricht am ehesten für eine Abhängigkeit der NSE-Produktion und des NSE-Gehaltes vom jeweiligen physiologischen Reifungs- oder Involutionsstadium der Riechzellen. Dies entspricht Ergebnissen von SCHMECHEL et al. (122), denen zufolge das Auftreten von NSE in Nervenzellen während der Fetalentwicklung von der funktionellen Reife abzuhängen scheint. Auch erfolgt im Lauf der Ontogenese in Neuronen des Gehirns ein Wandel von α -Enolase zu γ -Enolase (=NSE) (53). Mit dem von uns verwendeten Antiserum ist nur die γ -Enolase, nicht die α -Form des Enzyms darzustellen. Somit wäre denkbar, daß nur die reifen olfaktorischen Sinneszellen mit Verbindung zum ZNS NSE enthalten.

Die Morphologie der Riechnervenbündel in der Lamina propria ist innerhalb des Nervensystems einzigartig: Olfaktorische Axone verlaufen nicht isoliert, sondern in Form dicht gepackter Bündel in Hüllzellzytoplasmeeinbuchtungen und sind so in ihrem gesamten Verlauf vom olfaktorischen Epithel bis ins ZNS lediglich durch einen Interzellularspalt voneinander getrennt. Ob die biologische Bedeutung dieser Axonbündelung beispielsweise in einer Verstärkung der durch Geruchsreize ausgelösten Aktionspotentiale besteht, indem diese auf benachbarte Nervenfasern übertragen werden, ist bislang ungeklärt. Immerhin ist es aufgrund des engen Kontaktes der Axone kaum denkbar, daß elektrophysiologische Vorgänge der Depolarisation auf ein einzelnes Axon beschränkt bleiben. Die Hüllzellen der olfaktorischen Axone können weder den Schwannzellen im engeren Sinne, die um eine einzelne Nervenfasern eine Myelinscheide ausbilden, zugeordnet werden, noch entsprechen sie dem Typ der Remakzelle vegetativer Nerven, die mehrere Axone, jeweils einzeln und damit voneinander isoliert umhüllt. Demgegenüber fallen gewisse Gemeinsamkeiten mit Astrozyten des ZNS ins Auge: So kann in Hüllzellen der olfaktorischen Nerven GFAP (=glial fibrillary acidic protein), ein weitgehend astrozytäres Protein (11), nachgewiesen werden, das innerhalb des peripheren Nervensystems nur in einem sehr kleinen Anteil von Schwannzellen des N. ischiadicus (22,145) sowie in Zellen der Plexus myentericus und submucosus (65) enthalten ist. Auch die morphologischen Äquivalente dieses Strukturproteins, Filamente und Mikrotubuli, finden sich im Hüllzellzytoplasma. Die Bündelung der Nervenfasern durch olfaktorische Hüllzellen und durch Astrozyten im Bulbus olfactorius und im cerebellaren Cortex zeigt Ähnlichkeiten (115). Somit erscheint die Zuordnung der olfaktorischen Hüllzelle zur "astrocyte family" durch BARBER und LINDSAY (6) durchaus gerechtfertigt.

Das Vorhandensein GFAP-negativer Nervenbündel in der Lamina propria der Riechschleimhaut erklärt sich aus dem elektronenmikroskopisch gesicherten Vorkommen nichtolfaktorischer bzw.

"gemischter" Nervenbündel, deren Hüllzellen vom Remakzell- oder Schwannzelltyp nur in wenigen Ausnahmefällen GFAP enthalten.

Die olfaktorischen Hüllzellen ihrerseits sind innerhalb eines Nervenbündels durch endoneurales Bindegewebe voneinander getrennt. Dieses entspricht nach Textur und Morphe dem endoneuralen Gewebe peripherer Nerven. Ebenso zeigt das Perineurium olfaktorischer Nervenbündel, das Riechnervenbündel mit mindestens zwei Hüllzeleinheiten umgibt, keine Abweichungen von perineuralen Hüllen im peripheren Nervensystem. Als epineurales Äquivalent der olfaktorischen Nerven finden sich Fibrozyten, die den Übergang vom Perineurium, das jeweils das gesamte olfaktorische Nervenbündel umhüllt, ins umgebende Bindegewebe der Lamina propria bilden. Demgegenüber können in peripheren Nerven die vom Perineurium umsäumten Nervenfaserbündel durch ihr jeweiliges Epineurium noch untereinander zu umfangreicheren Nervenbündeleinheiten zusammengefaßt werden.

Das endo-, peri- und epineurale Bindegewebe sowie das Bindegewebe der gesamten Lamina propria enthalten neben Kollagenfasern relativ viel Elastin, was aufgrund der starren Unterlage der olfaktorischen Schleimhaut (überwiegend Knochenlamellen) ungewöhnlich erscheint. Bewegungen, die von außen auf das Gewebe übertragen werden, dürften nur von minimalem Ausmaß sein. Innerhalb der Lamina propria liegen jedoch neben den Nerven die Bowmanschen Drüsen und -vor allem in unmittelbarer Umgebung dieser Drüsen- zahlreiche glatte Muskelzellen, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen beweisen. Diese Muskelzellen verlaufen frei im Bindegewebe, d.h. nicht innerhalb der Basalmembran der Bowmanschen Drüsen. Sie sind also keine Myoepithelzellen! Die Funktion des Drüsensekretes besteht wohl in erster Linie im Ablösen der Geruchsmoleküle von den Rezeptoren, wodurch die Aufnahme eines neuen Sinnesindrucks wieder möglich wird. Kontraktionen glatter Muskelzellen dürften diesen Spüleffekt ermöglichen bzw. verstärken.

Die dabei auftretenden endogenen mechanischen Gewebsbeeinflussungen könnten der Grund für die elastische Stabilisierung der Riechschleimhaut sein.

In der Lamina propria liegen verschiedene Nervenbündeltypen vor, die sich nach Morphologie und Anzahl der Axone pro Hüllzelle unterscheiden. Die Tatsache, daß die olfaktorische Sinneszelle als einziges Neuron einem regelmäßigen, physiologischen Turnover mit einer Dauer von ca. 25-35 Tagen bei verschiedenen warmblütigen Wirbeltierspecies unterliegt (47,49,52,118), läßt vermuten, daß die Bündeltypen verschiedene d.h. phasenverschobene Stadien eines Regenerationszyklus repräsentieren.

Nervenbündel mit großen, gebläht wirkenden, runden Profilen geringer Elektronendichte, bei gleichzeitig relativ niedriger Zahl an Axonen pro Hüllzelle, sind in diesem Zusammenhang als Ausdruck fortschreitender physiologischer Degeneration zu deuten. Dabei werden geblähte, konfluierende Axonquerschnitte mit elektronendurchlässigem Axoplasma, die nur wenige oder keine Neurotubuli enthalten, offensichtlich von Hüllzellfortsätzen phagozytiert. In derartigen Bündeln nehmen die Hüllzellzytoplasmen einen großen Teil der Querschnittsfläche ein. Als Restkörper der Autophagie bleibt eine mit dem Alter der Tiere zunehmende Zahl von Lipofuszingranula im Hüllzellzytoplasma liegen.

Im Gegensatz zu dieser von uns beobachteten Form der Degeneration mit Aufblähung und geringer Elektronendichte der betroffenen Axone beschreiben SIMMONS et al. (129) beim Salamander nach experimenteller Rezeptorzelldegeneration (Axotomie) zunehmende Elektronendichte der zugrundegehenden Axone bei gleichzeitiger Schwellung der Hüllzellfortsätze. Allerdings wurden bei ähnlichen Versuchen an Ratten von GRAZIADEI und MONTI-GRAZIADEI (50) in den Glomerula des Bulbus olfactorius sowohl zunehmend elektronendichtere als auch elektronendurchlässigere Axonendigungen beobachtet und

als zwei voneinander unabhängige Degenerationsformen interpretiert. Degeneration mit Schrumpfung und Erhöhung der Elektronendichte des Axoplasmas war in unseren Proben in keinem Fall nachweisbar.

Die physiologische Axondegeneration kann in manchen Zellen der Nervenbündel mitunter sogar zum völligen Verlust von Nervenfasern führen. Offensichtlich befinden sich nicht nur einzelne Axone einer Hüllzelleinheit zum selben Zeitpunkt im gleichen Turnoverstadium, sondern jeweils die Mehrzahl der Nervenfasern, wodurch sich das Auftreten unterschiedlicher Nervenbündeltypen erklären läßt. In den meisten Fällen dürften somit nicht die intakten Axone reifer Riechzellen sondern die Hüllzellen als Leitschienen für die zentripetal aussprossenden Nervenfasern dienen.

Besonders auffallend sind die ungewöhnlichen axonalen Strukturen in einem Teil der olfaktorischen Nervenbündel. Naheliegender wäre die Entstehung der hantel- und röhrenförmigen Gebilde im Rahmen der Regeneration der olfaktorischen Rezeptorzellen und des zentripetalen Wachstums der Axone. Durch die Bildung derartiger eigentümlicher Strukturen vergrößert sich die Membranfläche der Axone um ein Vielfaches. Hinzu kommt, daß durch die häufig konzentrische oder lamelläre Schichtung dieser Formen die einzelnen Nervenfasern eine größere Kontaktfläche zueinander besitzen, was evtl. dem Informationsaustausch zwischen den Axonen dienen könnte. Allerdings treten keinerlei spezielle Verbindungen auf; stets liegt ein deutlicher Interzellularspalt zwischen den unveränderten Plasmamembranen der Nervenfasern. Leider konnte mittels der von uns angewendeten histologischen Methoden zwar die dreidimensionale Struktur rekonstruiert, aber nicht deren distales bzw. proximales Ende bestimmt werden. Auch über Funktion und physiologische Bedeutung derartiger Axonformen lassen elektronenmikroskopische und immunhistochemische Resultate keine Aussage zu.

3.3. Spontantumoren der Riechschleimhaut bei Hund und Katze

3.3.1. Anamnesen und makroskopische Befunde

Tgb.-Nr.	Rasse Alter Geschl.	Anamnese	Sektionsbefund
N 154/86	Katze 7-8 J. wbl	3 Wochen vor Euthanasie respiratorische Erscheinungen, z.T. blutiger Nasenausfluß; 5 Tage vor Euthanasie ZNS-Störungen, getrübbtes Sensorium, Ataxie, Manegebewegungen	Dattelgroße, relativ gut abgesetzte, weißliche, zerfließliche Zubildung in der linken Nasenhöhle und im linken Bulbus olfactorius
N 287/84	Labrador 10 J. wbl kastr.	15 Tage vor Tötung dreiminütiger Anfall mit Speicheln, Krämpfen, Aggressivität; weitere Anfälle; Verschlechterung trotz Behandlung; 7 Tage vor Euthanasie schwankender Gang, Umfallen, unmotiviertes Heulen; kann kaum selbstständig aufstehen und weder kauen noch schlucken; Hirntumorverdacht	Dattelgroßer Tumor mit begleitenden Blutungen im Bereich der rechten Nasenhöhle, des Siebbeinlabyrinthes und des Bulbus olfactorius mit Infiltration der rechten Großhirnhemisphäre bis zum Corpus striatum

N 221/86	Pudel	2-3 Wochen vor	Kirschgroße, ins Riech-
	11 J.	Euthanasie zu-	hirn einbrechende
	ml	nehmend aggressi-	Neubildung in der
		ves Verhalten;	Nasenhöhle
		1 Woche vor	
		Euthanasie schmerz-	
		haftes Abdomen	
P 2000/78	Siam-	Hirntumorverdacht	Kirschgroßer, grau-
	katze		weißer Tumor im Bereich
	3 J.		des Siebbeins und
	ml		des Bulbus olfactorius
	kastr.		
N 167/84	Katze	10 Tage vor Tod	Gut haselnußgroße,
	7 J.	Nasenbluten;	weiche Zubildung im
	ml	deutlich erkenn-	Bereich der linken Na-
		bare Umfangsver-	senhöhle und Nasenneben-
		mehrung des lin-	höhlen, des Siebbeins und
		ken Nasenberei-	des Bulbus olfactorius
		ches; zunehmende	mit Kompression der
		Hinfälligkeit	Frontalhirnrinde
P 2360/78	Katze	1 Woche vor Eutha-	Kirschgroße, unregelmäßig
	6 J.	nasie Schmerzen	geformte, grau-rötlich-
	wbl	an Ohr und Abdomen;	bräunliche, schleimige
		1 Tag vor Euthana-	Neubildung im Siebbein-
		sie Streckkrämpfe	bereich, die sich auch
		und Nystagmus	auf den Bulbus olfacto-
			rius erstreckt
N 135/85	Rauhhaar-	Keine tumor-	Kirschgroßer, rötlicher
	dackel	bedingten	Tumor im Bereich des
	12 J.	klinischen	Riechhirns links
	ml	Erscheinungen	

N 283/85	Katze 3 J. wbl kastr.	Chronische Rhinitis; Anorexie, Kachexie; Euthanasie 4 Wochen nach der ersten Vorstellung	Bohnengroße Zubildung im Bereich des Bulbus olfactorius mit tiefer Infiltration des Großhirns
N 218/85	Collie 9 J. ml	Einige Wochen vor Euthanasie Wesensveränderung; 4 Wochen vor Euthanasie Rhinitis, Verlust des Geruchssinns; ca. 14 Tage später Krampfanfälle, Status epilepticus; Kaukrämpfe, Kopfschiefhaltung, Manegebewegungen; ab 5. Tag vor Tötung Seitenlage, Winseln, nicht ansprechbar; Hirntumorverdacht	Kirschgroßer Tumor im Bereich des linken Bulbus olfactorius mit Impression und Infiltration des Gehirns
N 258/84	Afghane 12 J. wbl	Manegebewegungen, Seitenlage mit Opisthotonus; keine Reaktion auf äußere Reize; Schreikrämpfe; Hirntumorverdacht	Taubeneigroße Neubildung im Bereich der rechten Nasenhöhle, des Siebbeins und des Bulbus olfactorius mit Kompression des Hirngewebes bis in Höhe des Corpus striatum

3.3.2. Neurohistologische Befunde

Tgb.-Nr.	Wuchsform	Zytologische Charakteristika
N 154/86	Alveoläre Struktur; zahlreiche Blutgefäße	Zellen mit sehr hohem Zytoplasmaanteil und kleinen Kernen mit stark kondensiertem Chromatin; Zellen der echten Rosetten mit basal liegenden Kernen und apikalem Zottenbesatz
N 287/84	Unregelmäßig alveoläre Struktur; palisadenartige Anordnung; Reste des olfaktorischen Epithels mit Tumorzellanhäufungen zwischen Drüsen- und Nervenquerschnitten	Tumorzellen mit relativ großen, chromatinarmen Kernen; Z.T. auch kleine Nuclei mit kondensiertem Chromatin; Zellen der echten Rosetten mit mittelgroßen Kernen und normal konfiguriertem Chromatin sowie apikalem Zottenbesatz
N 221/86	Lobuläre Struktur mit einem hohen Anteil an Stromagewebe	Mittelgroße Tumorzellen mit weitgehend normalem Chromatingerüst; rosettenbildende Zellen mit apikalem Zottenbesatz
P 2000/78	Nur spärliches Stroma; z.T. Nervenfasern im Tumorgewebe erkennbar	Zytoplasmareiche Zellen mit mittelgroßen, chromatinreichen Kernen
N 167/84	Lobuläre Struktur mit hohem Anteil an Stromagewebe	Tumorzellen mit mittelgroßen Kernen und überwiegend normalem Chromatingerüst; daneben kleinere Kerne mit stark kondensiertem Chromatin

Rosetten (R) Pseudoroset- ten (Ps)	Mitosen	Nekrosen	Blutungen	Diagnose
R u. Ps +++	+ / ++	++ (Zentrum)	-	Ästhesioneuro- epitheliom
R u. Ps ++	+++	++ (Zentrum)	++	Ästhesioneuro- epitheliom
R u. Ps ++	+++	++	-	Ästhesioneuro- epitheliom
R ++ Ps +	++ / +++	+	-	Ästhesioneuro- blastom
R u. Ps ++	+++	++ / +++ (v.a. im Zentrum)	+++	Ästhesioneuro- blastom

Tgb.-Nr.	Wuchsform	Zytologische Charakteristika
P 2360/78	Vorwiegend anaplastisch, teils lobulär konfiguriert; daneben kollagenreiches Stroma in Zügen angeordnet	Kleinkernige Tumorzellen mit stark kondensiertem Chromatin; nur vereinzelt Nucleoli erkennbar
N 135/85	In Reihen und Zügen angeordnete Zellen; kaum Stromagewebe; z.T. Nervenbündel zwischen den Tumorzellen erkennbar	Zytoplasmaarme Tumorzellen mit teilweise mittelgroßen teilweise sehr kleinen Kernen mit weitgehend normal ausgeprägtem Chromatin
N 283/85	Lobuläres Wachstum; palisadenartige Anordnung der pleomorphen Tumorzellen	Überwiegend kleine bis mittelgroße, zytoplasmaarme Zellen mit unterschiedlich geformten, chromatinreichen Kernen
N 218/85	Stark anaplastischer Habitus; zelldichtes Gewebe; zahlreiche Gefäßeinbrüche	Mittelgroße Tumorzellen; Nuclei mittlerer Größe mit weitgehend normal konfiguriertem Chromatin
N 258/84	Lobuläre Struktur, häufig mit zentralen Blutgefäßen; starke Vaskularisation	Große Tumorzellen mit hohem Zytoplasmaanteil und großen, chromatinarmen Kernen mit deutlichen Nucleoli

Rosetten (R) Pseudorosetten (Ps)	Mitosen	Nekrosen	Blutungen	Diagnose
R +- Ps +	++	++ (Tumor- rand)	+	Ästhesioneuro- blastom
R u. Ps +	++	++/+++	-	Ästhesioneuro- blastom
R - Ps +-	++/+++	+++	+++	Ästhesioneuro- blastom
R +- Ps ++	++	++ (Zentrum)	-	Ästhesioneuro- blastom
R u. Ps -	+/++	+++	+ (Tumor- rand)	Ästhesioneuro- blastom

Zeichenerklärung :

- = keine + = geringgradig
 +- = vereinzelt ++ = mittelgradig +++ = hochgradig

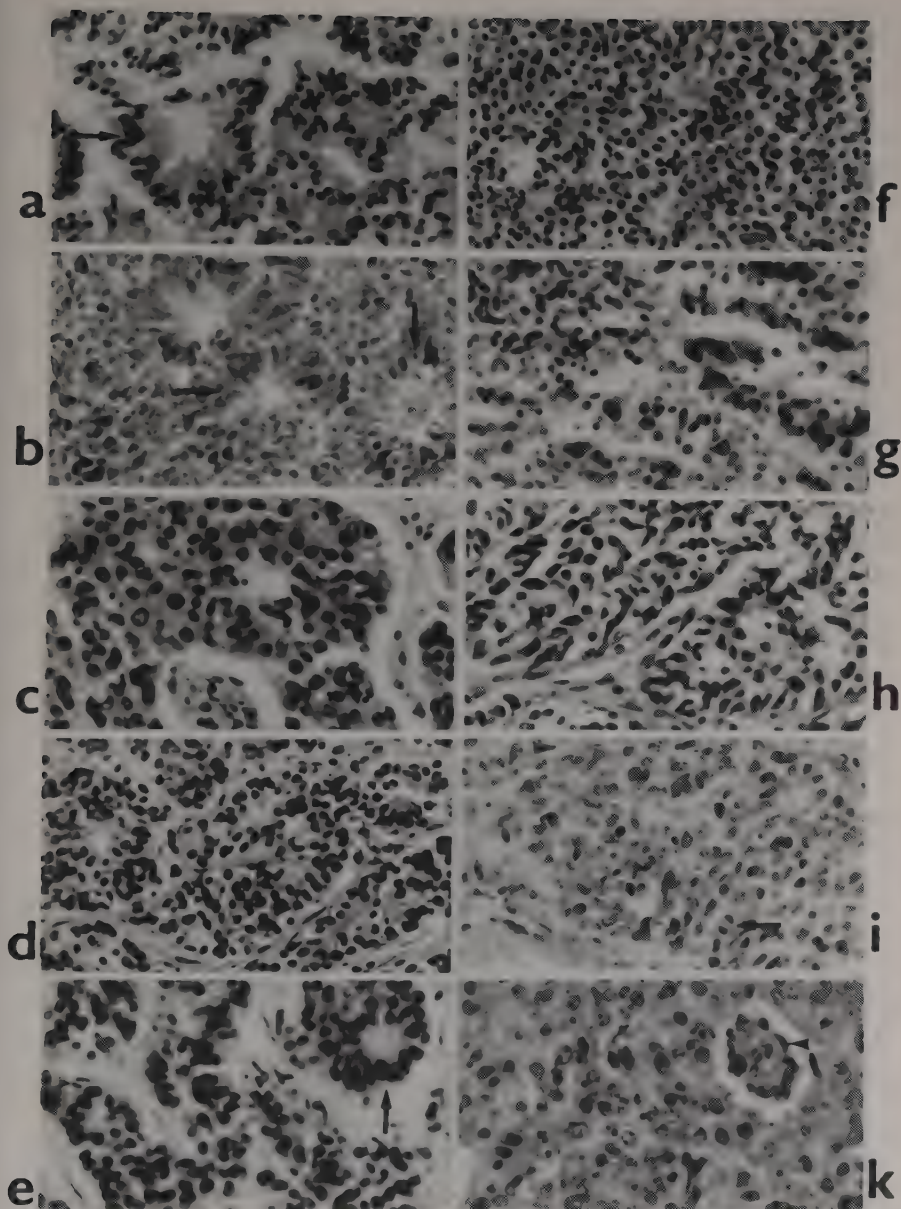
Die Tumoren N 167/84, N 258/84, N 287/84 sowie P 2000/78 und P 2360/78 wurden von DAHME et al. 1985 (23) bzw. POSPISCHIL und DAHME 1981 (114) veröffentlicht. Im Rahmen dieser beiden Arbeiten wurden die Tumoren lichtmikroskopisch und die drei Letztgenannten auch elektronenmikroskopisch charakterisiert.

Abb. 27:

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen typische Bereiche der zehn untersuchten Riechschleimhauttumoren, jeweils in der selben Vergrößerung und mit abnehmendem Differenzierungsgrad.
Vergr. 300 x

- a: N 154/86
- b: N 287/84
- c: N 221/86
- d: P 2000/78
- e: N 167/84
- f: P 2360/78
- g: N 135/85
- h: N 283/85
- i: N 218/85
- k: N 258/84

Echte Rosetten (↑)
 Echte Rosetten mit apikalem Zottenbesatz (→)
 Pseudorosetten (↓)
 Mitosefigur (←)
 Blutgefäß (◀)



3.3.3. Immunhistochemische Ergebnisse

Alle vorliegenden Tumoren der olfaktorischen Schleimhaut wurden immunhistochemisch auf das Vorhandensein von GFAP (=glial fibrillary acidic protein), S 100 (=S 100-Protein) und NSE (=neuron-specific enolase) untersucht.

Ohne Ausnahme enthalten alle zehn Tumoren GFAP-positive Zellen. Diese teils langgestreckten teils sternförmigen Zellen liegen überwiegend am Tumorrand und bilden in vielen Fällen eine intensiv gefärbte Umhüllung, von welcher Fortsätze der Zellen ins Innere des Tumorgewebes ziehen und z.T. ein dreidimensionales Netz bilden (Abb. 28). Vereinzelt liegen bevorzugt im nasalen Anteil des Tumors positiv reagierende, langgestreckte Zellgruppen mit wellenförmigem Verlauf. Auftreten und Ausmaß der Immunreaktion sind unabhängig vom Differenzierungsgrad des entsprechenden Tumors.

Bei den GFAP-positiven Zellen handelt es sich nicht um Tumorzellen im eigentlichen Sinne; vielmehr lassen sich mittels GFAP-Antiserum gliale Elemente der Riechschleimhaut, des Riechhirns und weiterer betroffener ZNS-Bereiche darstellen. Die langgestreckten, wellenförmigen Zellen in nasalen Tumorebenen und im Siebbeinbereich sind Reste der Fila olfactoria, d.h. speziell der Hüllzellen der olfaktorischen Axone, die physiologischerweise GFAP enthalten (siehe 3.2.2.2.).

S 100, ein innerhalb des Nervensystems gliaspezifisches Protein, ist ebenfalls in allen Tumoren nachweisbar, unabhängig von deren Differenzierungsgrad. Die Lokalisation der Immunreaktion deckt sich nicht mit jener von GFAP. Die gefärbten Zellen sind aber ebenso teils langgestreckt teils mit Fortsätzen ausgestattet und liegen wiederum bevorzugt in den Randbezirken des Tumors. Die Art der S 100-positiven Zellen kann nicht eindeutig bestimmt werden, da außer in Gliazellen in zahlreichen Zellen außerhalb des Nervensystems sowie in Zellen verschiedenster Tumoren S 100 nachgewiesen wurde.

In allen zehn Tumoren finden sich vereinzelt NSE-positive Zellen. Die Immunreaktion des Tumorgewebes mit NSE-Antikörpern ist durchweg schwächer ausgeprägt als jene mit anti-GFAP und anti-S 100. NSE-positive, runde bis ovale Zellen im Bereich des Tumors bilden häufig kleine Zellgruppen (Abb. 29). Bei der Überwiegenden Zahl dieser Zellen dürfte es sich um Nervenzellen jenes Gewebes handeln, das tumorös infiltriert wird, d.h. meist Nervenzellen des Bulbus olfactorius. Wiederum zeigt das Vorhandensein von NSE keine Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Riechschleimhauttumors.

In einzelnen Fällen (vor allem bei Tumor Nr. N 154/86) konnten NSE-positive Zellen mit rosettenförmiger Anordnung beobachtet werden (Abb. 30).

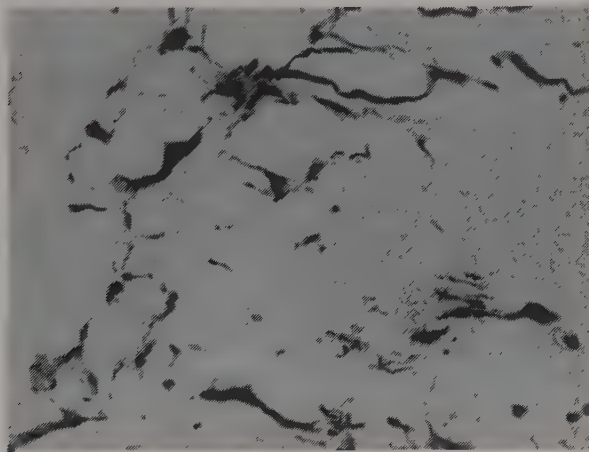
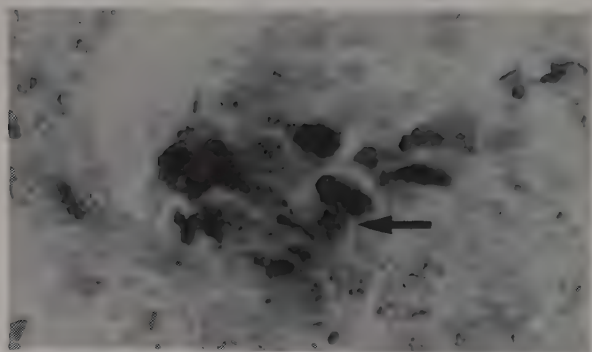
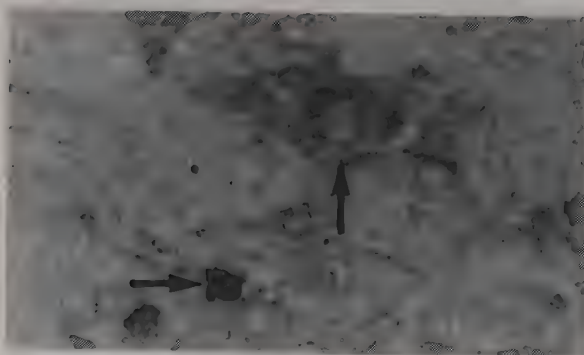


Abb. 28: GFAP-Immunreaktion
 Tumor-Nr. N 154/86
 Vergr. 300 x

GFAP-positive, fortsatzreiche Zellen die vom Tumorrand in das Tumorparenchym ziehen und sich zum Tumorzentrum hin verlieren.



29



30

Abb. 29, 30: NSE-Immunreaktion

Abb. 29: Tumor-Nr. N 135/85

Abb. 30: Tumor-Nr. N 154/86

Vergr. 750 x

NSE-positive Zellen finden sich im Tumorgewebe sowohl einzeln liegend (→), in kleinen Gruppen (←) oder rosettenförmig angeordnet (↑).

3.3.4. Diskussion zu Tumoren der Riechschleimhaut bei Hund und Katze

Primäre Riechschleimhauttumoren zählen bei Mensch und Haus-
säugetieren zu den selten auftretenden Neubildungen (3% aller
Nasentumoren beim Menschen (125); 10 Fälle bei Hunden und
Katzen im Sektionsgut des pathologischen Institutes innerhalb
von 8 Jahren), haben jedoch i.d.R. sehr früh fatale Auswir-
kungen: Die olfaktorische Schleimhaut befindet sich in
unmittelbarer Nachbarschaft des Gehirns. Nur getrennt durch
die sehr dünne Knochenplatte des Ethmoids steht sie über die
Axone der Riechzellen und deren Hüllen durch zahlreiche
Öffnungen in der Siebbeinplatte bzw. via Bulbus olfactorius
direkt mit dem ZNS in Verbindung. So ist leicht zu verstehen,
daß die durchweg malignen Tumoren häufig entlang der olfakto-
rischen Nervenbahnen ins ZNS einwachsen. Durch Kompression
und/oder Infiltration von Hirngewebe hervorgerufene, neurolo-
gische Symptome sind deshalb die weitaus häufigsten
klinischen Erscheinungen. In wenigen Fällen treten zunächst
respiratorische Störungen auf, gefolgt von Symptomen von
Seiten des ZNS. Weit seltener sind Verlaufsbilder mit
ausschließlich "rhinitischen" Symptomen.

Wie auch beim Menschen entstehen Ästhesioneuroblastome oder
-epitheliome bei Haussäugetieren mit wenigen Ausnahmen in der
zweiten Lebenshälfte. (Allerdings befinden sich in unserem
Material zwei Tumoren, die ca. dreijährige Katzen betreffen.
Der bei einer 14 Monate alten Kalbin von ANDERSON und CORDY
(2) beschriebene Fall ist mit Zurückhaltung zu bewerten, da
die gezeigten histologischen Befunde nicht überzeugen und
keine weitergehenden Untersuchungen gemacht wurden.) Die
Tumoren der olfaktorischen Schleimhaut können somit nicht in
die Gruppe der "echten" Neuroblastome mit dysgenetischer
Entstehung, wie sie regelmäßig bei sehr jungen Menschen und
Tieren auftreten, eingereiht werden (23).

Da es sich bei olfaktorischen Rezeptorzellen, im Gegensatz zu allen anderen Neuronen, um intermitotische Zellen mit physiologischem Involutions/Regenerationszyklus handelt und damit um grundsätzlich irritierbare Zellen, könnten, wie bereits von DAHME et al. (23) diskutiert, atmosphärische Umweltkanzerogene bei der Entstehung primärer Riechschleimhauttumoren durchaus eine Rolle spielen.

Obwohl Hinweise auf den neurogenen Charakter dieser Tumoren bestehen, wie elektronenmikroskopische Nachweise von Neuriten, neurotubulären und -filamentären Elementen, sowie Kinetosomen und Cilien, ist die Histogenese zumindest nicht für alle Typen olfaktorischer Tumoren geklärt. Nervenzellspezifische Strukturen treten nicht in allen untersuchten Tumoren auf, so daß neben den Blastemzellen -den Stammzellen der Riechzellen- auch alle anderen intermitotischen Zelltypen der Riechschleimhaut als Ausgangsgewebe in Betracht kommen. Die Stützzellen des Epithels, die Hüllzellen der olfaktorischen Axone, die Bowmanschen Drüsenzellen und die glatten Muskelzellen in der Lamina propria müssen in derartige Überlegungen einbezogen werden. Möglicherweise ist auch die deutlich variierende lichtmikroskopische Morphologie, die eine exakte Diagnosestellung ohne weitergehende Untersuchung z.T. unmöglich macht, bedingt durch unterschiedliche Histogenese.

Im Hinblick auf diese Frage und mit der Intention, weitere Kriterien für die Diagnostik zu erarbeiten, wurden immunhistochemische Untersuchungen sowohl an der normalen Riechschleimhaut als auch an deren Tumoren durchgeführt. Die Ergebnisse fielen jedoch eher enttäuschend aus.

NSE (=neuron-specific enolase) konnte zwar in allen olfaktorischen Tumoren, jedoch nur in wenigen Fällen eindeutig in Tumorzellen nachgewiesen werden. Bei den meisten positiv reagierenden Zellen handelte es sich um primär existente Nervenzellen des Bulbusbereichs (Mitralzellen u.ä.) von

Tumordinfiltrationen überwuchert. Demgegenüber beschreiben CHOI und ANDERSON (19)NSE-positive Tumorzellen in allen untersuchten, menschlichen Tumoren, allerdings in ähnlicher Anordnung wie in unseren caninen bzw. felines Fällen. Ob diesen divergierenden Ergebnissen lediglich unterschiedliche Interpretationen, Speciesunterschiede oder unterschiedliche Krankheitsdauer -da i.d.R. wohl beim Menschen derartige Tumoren in einem früheren Stadium diagnostiziert werden zugrunde liegen, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

GFAP (=glial fibrillary acidic protein) fand sich in keinem Fall in Tumorzellen, sondern stets in glialen Elementen des Ursprungsgewebes bzw. des infiltrierten Gewebes, meist in Form einer Umhüllung oder in Form von Septen. Auch bei bisher untersuchten menschlichen Riechschleimhauttumoren konnte, wenn überhaupt, GFAP nur in Astrozyten dargestellt werden (19).

S 100 (=S 100-Protein) wurde von CHOI und ANDERSON (19,20) an menschlichen Tumoren in satelliten- bzw. schwannzellähnlichen Zellen, die eine kontinuierliche Umhüllung von Tumorzellnestern bilden, nachgewiesen. Diese Zellen sind gegen das Bindegewebe der Lamina propria durch eine Basalmembran abgegrenzt. Unsere Tumoren reagierten ebenfalls mit S 100-Antiserum: Die positiven Zellen zeigen zwar eine ähnliche Anordnung wie jene von CHOI und ANDERSON (19,20) beobachtete, die vollständige Umhüllung kleinerer Tumorknoten durch S 100-positive Zellen trat jedoch nicht auf. Die gefärbten Zellen fanden sich überwiegend randständig oder in Form von Septen, die in das Tumorparenchym eindringen. Diese zelluläre Verteilung entspricht zwar auf den ersten Blick jener von GFAP, die GFAP- und S 100-positiven Zellen sind jedoch weitgehend nicht identisch; GFAP kann auch nur in astrozytären Elementen erwartet werden.

NSE, GFAP und S 100 wurden für unsere Versuche ausgewählt, da sie einerseits als Antigene des Nervensystems gelten, andererseits im Handel erhältlich und somit problemlos verfügbar sind. Da jedoch kein typisches Lokalisationsmuster für diese drei Proteine besteht, ist die immunhistochemische Untersuchung olfaktorischer Tumoren bezüglich dieser Antigene zunächst nur von geringer diagnostischer Bedeutung.

Vielfach führt bereits die alleinige lichtmikroskopische Untersuchung der Tumoren zur eindeutigen Diagnose "Ästhesioneuroblastom bzw. -epitheliom". Ist dies aufgrund einer weniger typischen Ausprägung nicht möglich, was i.d.R. bei Riechschleimhauttumoren mit einem niedrigen Differenzierungsgrad, d.h. vor allem ohne deutliche Ausbildung von Rosetten und/oder Pseudorosetten, der Fall ist, kann auch die elektronenmikroskopische Untersuchung nicht immer alle Zweifel beseitigen. Der Grund hierfür liegt in der Technik der Elektronenmikroskopie: Elektronenmikroskopische Proben können wegen ihres zwangsläufig geringen Umfanges nur eng begrenzte Bereiche des Tumorgewebes repräsentieren und müssen deshalb nicht unbedingt für den Gesamttumor charakteristisch sein. Zudem muß das Gewebe in frischem Zustand fixiert werden, um wertvolle elektronenmikroskopische Befunde erheben zu können.

Um in weder licht- noch elektronenmikroskopisch zu klärenden Fällen eine Diagnose stellen zu können, wären weitere aussagekräftige Untersuchungsmethoden wünschenswert. Da sich der immunhistochemische Nachweis von NSE, GFAP und S 100 für diagnostische Zwecke als wenig brauchbar erwies, richtet sich derzeit die Hoffnung auf das sogenannte "olfactory marker protein" (=OMP), welches innerhalb des Organismus ausschließlich in olfaktorischen Rezeptorzellen (und Zellen des Vomeronasalorganes) enthalten ist (58). Der Versuch des immunhistochemischen Nachweises dieses riechzellspezifischen Antigens in Tumoren der olfaktorischen Schleimhaut könnte sowohl diagnostisch als auch als Beitrag zur Klärung der Histogenese von Interesse sein. Da jedoch Antikörper gegen

OMP im Handel nicht erhältlich sind, wären zunächst aufwendige Arbeitsgänge zur Isolation des Proteins sowie Gewinnung und Aufbereitung der Antikörper nötig, um die eigentlichen immunhistochemischen Versuche durchführen zu können. Derartige biochemische und immunologische Arbeiten hätten den Rahmen dieser Arbeit gesprengt, weshalb wir uns auf die Verwendung käuflicher Antikörper beschränkten.

Der immunhistochemische Nachweis von NSE, GFAP und S 100 läßt auch keine fundierten Aussagen über Ausgangsgewebe zu. Das nur seltene Auftreten von NSE beweist weder den neurogenen Charakter der Tumoren, noch berechtigt das Fehlen von GFAP in Tumorzellen zum Ausschluß der olfaktorischen Hüllzellen, die physiologischerweise GFAP enthalten (6), als Ursprungsgewebe. Neoplastische Zellen sind auch in Bezug auf die Fähigkeit zur Synthese von Antigenen bis zu einem gewissen Grad autonom.

4. Zusammenfassung

Die normale olfaktorische Schleimhaut von 12 klinisch gesunden Hunden verschiedener Rassen und Altersgruppen wurde elektronenmikroskopisch und immunhistochemisch untersucht.

Dabei ergab die Feinstruktur der neuronalen Elemente innerhalb des Epithels keine grundlegenden Unterschiede zu anderen warmblütigen Wirbeltieren. Neben überwiegend regelmäßigen neuroaxonalen Strukturen finden sich in der Lamina propria ungewöhnliche axonale Formen, die mit keinerlei neuronalen Strukturen anderer Gewebe vergleichbar sind.

Die Riechschleimhaut enthält unterschiedliche Typen olfaktorischer Nervenbündel, möglicherweise abhängig vom jeweiligen Turnoverstadium der Riechzellen, wobei sich i.d.R. ein Großteil der Sinneszellen eines Bündels in dem gleichen Stadium der physiologischen Involution bzw. Regeneration befindet. Folglich können Bündel mit oben genannten, eigentümlichen axonalen Strukturen als Bündel im Stadium der Regeneration interpretiert werden.

Die Umscheidung olfaktorischer Axone durch spezielle Hüllzellen weicht morphologisch von jener des Schwannzell- und Remakzelltyps ab. Immunhistochemisch kann in diesen Hüllzellen auch GFAP (=glial fibrillary acidic protein), ein in Schwann- und Remakzellen nicht enthaltenes Protein, nachgewiesen werden.

Die Riechzellen enthalten teilweise NSE (=neuron-specific enolase). Innerhalb der Lamina propria zeigen die Nervenbündel S 100 (=S 100-protein)-positive Immunreaktion, die anscheinend die Hüllzellen betrifft.

Im Hinblick auf die Onkologie der Riechschleimhaut wurden 10 spontane Tumoren bei Hund und Katze aus dem Sektionsgut des Tierpathologischen Institutes lichtmikroskopisch sowie immunhistochemisch untersucht.

Als Charakteristikum enthalten die Tumoren (mit Ausnahme eines Tumors) Pseudorosetten und/oder Rosetten in mehr oder weniger ausgeprägter Form. Höher differenzierte Ästhesioneuroepitheliome besitzen zahlreiche Rosetten, teilweise mit epikalem Zottenbesatz. Je niedriger der Differenzierungsgrad der Tumoren (vor allem der Ästhesioneuroblastome), desto schwieriger wird die Diagnosestellung aufgrund lichtmikroskopischer Kriterien.

Die immunhistochemische Untersuchung der Riechschleimhauttumoren mit Antiseren gegen NSE, GFAP und S 100 ergab kein typisches, für diagnostische Zwecke verwertbares Verteilungsmuster: Nur wenige Tumorzellen waren NSE-positiv; GFAP fand sich nur in glialen Zellen des infiltrierten Gewebes; die S 100-Immunreaktion im Tumorgewebe ließ keine eindeutige Zuordnung zu einer Zellpopulation zu.

Im Hinblick auf die Histogenese der Riechschleimhauttumoren sind die immunhistochemischen Resultate derzeit nur von geringer Aussagekraft.

ELECTRON-MICROSCOPIC AND IMMUNHISTOCHEMICAL STUDIES OF THE NEURAL ELEMENTS OF THE CANINE OLFACTORY MUCOSA AND LIGHT-MICROSCOPIC AND IMMUNHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SPONTANEOUS TUMOURS OF THE OLFACTORY MUCOSA IN DOGS AND CATS

The olfactory mucosa of 12 clinically healthy dogs of different breeds and ages was examined electron-microscopically and immunohistochemically.

The electron-microscopic structure of the neural components of the canine olfactory mucosa do not reveal any basic differences within the epithelium to other warm-blooded vertebrates. Besides the predominating regular neuroaxonal structures also unusual axonal forms, not comparable with the neural structures of any other tissue, are to be found in the lamina propria.

The olfactory mucosa comprises different types of olfactory nerve bundles, which might be dependent on the actual stage of turnover of the olfactory neurons. As a rule, most of the sensory neurons of an individual bundle are in the same stage of physiological involution or regeneration, respectively. Consequently, bundles containing numerous special axonal structures are to be interpreted as bundles in certain phases of regeneration.

The embracing of olfactory axons by special sheath cells differs morphologically from the Schwann cell as well as from the Remak cell type. Immunohistochemically, GFAP (=glial fibrillary acidic protein) not occurring in Schwann and Remak cells can be evidenced in these sheath cells.

The olfactory neurons partly contain NSE (=neuron-specific enolase). Within the lamina propria the nerve bundles reveal S 100 (=S 100-protein) positive immunostaining, obviously directed to the sheath cells.

Concerning the oncology of the olfactory mucosa 10 spontaneously occurring tumours observed in dogs and cats were studied light-microscopically as well as immunohistochemically.

The characteristic features of those esthesioneurogenic tumours are (except for one tumour) pseudo-rosettes and/or true rosettes, which presented themselves in a more or less clear shape. Higher differentiated esthesioneuroepitheliomas contain numerous rosettes partly furnished with villi. The lower the grade of differentiation (especially in the group of esthesioneuroblastomas) the more difficult the histological diagnosis becomes.

The immunohistochemical examination of the tumours based upon antisera against NSE, GFAP and S 100 in our study did not reveal a typical distribution pattern efficient for diagnostic purposes: Only a few tumour cells were NSE-positive; GFAP was found only in the glial cells of the infiltrated brain tissue; the S 100 immunostaining reaction in the tumour tissue did not allow a definite allocation to a certain population of cells. Thus, the immunohistochemical results are in the present stage of little evidence in view of the histogenesis of esthesioneuroblastic tumours.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Allison, A.C. and Warwick, R.T.T.:
Quantitative observations on the olfactory system of
the rabbit
Brain 72, 186-197 (1949)
- 2) Anderson, B.C. and Cordy, D.R.:
Olfactory neuroblastoma in a heifer
Vet. Pathol. 18, 536-540 (1981)
- 3) Andres, K.H.:
Differenzierung und Regeneration von Sinneszellen in
der Regio olfactoria
Naturwiss. 17, 500-501 (1965)
- 4) Andres, K.H.:
Der Feinbau der Regio olfactoria von Makrosomatikern
Z. Zellforsch. 69, 140-154 (1966)
- 5) Andres, K.H.:
Der olfaktorische Saum der Katze
Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 96, 250-274 (1969)
- 6) Barber, P.C. and Lindsay, R.M.:
Schwann cells of the olfactory nerves contain glial
fibrillary acidic protein and resemble astrocytes
Neuroscience 7, 3077-3090 (1982)
- 7) Barber, P.C. and Raisman, G.:
Cell division in the vomeronasal organ of the adult
mouse
Brain Res. 141, 57-66 (1978)
- 8) Barber, P.C. and Raisman, G.:
Replacement of receptor neurons after sections of the
vomeronasal nerves in the adult mouse
Brain Res. 147, 297-313 (1978)
- 9) Berger, L., Luc, G. et Richard, D.:
L'ésthésioneuroépithéliome olfactif
Bull. Ass. Franc. Etude Cancer 13, 410-421 (1924)
- 10) Berger, L., Coutard, H.:
L'ésthésioneurocytome olfactif
Bull. Ass. Franc. Etude Cancer 15, 404-421 (1926)
- 11) Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D., Uyeda, C.T.:
Localisation of the glial fibrillary acidic protein in
astrocytes by immunofluorescence
Brain Res. 43, 429-435 (1972)
- 12) Breipohl, W., Langwitz, H.J., Bornfeld, N.:
Topological relations between the dendrites of
olfactory sensory cells and sustentacular cells in
different vertebrates
An ultrastructural study
J. Anat. 112, 89-94 (1974)

- 13) Bronshtein, A.A.:
Intravital observation on movement of the hairs of the
olfactory cells
Doklady Akademii Nauk SSSR 156, 715 (1964)
- 14) Burton, P.R.:
Luminal material in microtubules of frog olfactory
axons: structure and distribution
J. Cell Biol. 99, 520-528 (1984)
- 15) Burton, P.R.:
Ultrastructure of the olfactory neuron of the bullfrog:
the dendrite and its microtubules
J. Comp. Neurol. 242, 147-160 (1985)
- 16) Cancalon, P.:
Degeneration and regeneration of olfactory cells
induced by ZnSO₄ and other chemicals
Tissue Cell 14, 717-733 (1982)
- 17) Cancalon, P.:
Regeneration of three populations of olfactory axons as
a function of temperature
Brain Res. 285, 265-278 (1983)
- 18) Chaudhry, A.P., Haar, J.G., Koul, A., Nickerson, P.A.:
Olfactory neuroblastoma (esthesioneuroblastoma)
A light and ultrastructural study of two cases
Cancer 44, 564-579 (1979)
- 19) Choi, H.S.-H., Anderson, P.J.:
Immunohistochemical diagnosis of olfactory neuroblastoma
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 44, 18-31 (1985)
- 20) Choi, H.S.-H., Anderson, P.J.:
Olfactory neuroblastoma: an immun-electron microscopic
study of S-100 protein-positive cells
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 45, 576-587 (1986)
- 21) Correa, P., Dalgard, D.W., Adamson, R.H.:
Olfactory neuroepithelioma in a Cynomolgus monkey
(*Macaca fascicularis*)
J. med. Primatol. 4, 51-61 (1975)
- 22) Dahl, D., Chi, N.H., Miles, L.E.:
GFA-P in Schwann cells
J. Histochem. Cytochem. 30, 912-918 (1982)
- 23) Dahme, E., Bilzer, Th., Mannl, A.:
Zur Diagnose primärer Riechschleimhauttumoren, darge-
stellt an einem Ästhesioneuroepitheliom beim Hund
Tierärztl. Prax. Suppl. 1, 112-122 (1985)
- 24) Dayal, Y., DeLellis, R.A., Tischler, A.S., Mittell, M.,
Tallberg, K., Nunnemacher, G., Wolfe, H.J.:
Olfactory neuroblastoma: an ultrastructural and
immunohistochemical study
Lab. Invest. 52, 17A-18A (1985)

- 25) DeLorenzo, A.J.:
Studies on the ultrastructure and histophysiology of
cell membranes, nerve fibers and synaptic junctions in
chemoreceptors
In: Zotterman, Y. (ed): Olfaction and Taste, Pergamon,
Oxford (1963) pp 5-17
- 26) Doucette, J.R., Kiernan, J.A., Flumerfelt, B.A.:
Two different patterns of retrograde degeneration in
the olfactory epithelium following transection of
primary olfactory axons
J. Anat. 136, 673-689 (1983)
- 27) Elkon, D., Hightower, St.I., Lim, M.L., Cantrell, R.W.,
Constable, W.C.:
Esthesioneuroblastoma
Cancer 44, 1087-1094 (1979)
- 28) Eng, L.T., Vanderhaegen, J.J., Bignami, A., Gerstl, B.:
An acidic protein isolated from fibrous astrocytes
Brain Res. 28, 351-354 (1971)
- 29) Farbman, A.I., Margolis, F.L.:
Olfactory marker protein during ontogeny: immunohisto-
chemical localization
Devel. Biol. 74, 205-215 (1980)
- 30) Ferriero, D., Margolis, F.L.:
Denervation in the primary olfactory pathway of mice
II. Effects on carnosine and other amine compounds
Brain Res. 86, 75-86 (1975)
- 31) Frisch, D.:
Ultrastructure of the mouse olfactory mucosa
Am. J. Anat. 121, 87-120 (1967)
- 32) Fujita, I.:
Concept of paraneurons
Arch. Histol. Jpn. 40 Suppl., 1-12 (1977)
- 33) Gasser, H.S.:
Olfactory nerve fibers
J. gen. Physiol. 39, 473-496 (1956)
- 34) Getchell, T.V.:
Analysis of unitary spikes recorded extracellularly
from frog olfactory receptor cells and axons
J. Physiol. (Lond.) 234, 533-551 (1973)
- 35) Getchell, T.V.:
Electrogenic sources of slow voltage transients recorded
from frog olfactory epithelium
J. Neurophysiol. 37, 1115-1130 (1974)
- 36) Getchell, T.V.:
Analysis of intracellular recordings from salamander
olfactory epithelium
Brain Res. 123, 275-286 (1977)

- 37) Gheuens, J., de Schutter, E., Noppe, M., Lowenthal, A.:
Identification of several forms of the glial fibrillary
acidic protein, or -albumin, by a specific
monoclonal antibody
J. Neurochem. 43, 964-970 (1984)
- 38) Graziadei, P.P.C.:
Topological relations between olfactory neurons
Z. Zellforsch. 118, 449-466 (1971)
- 39) Graziadei, P.P.C.:
The olfactory mucosa of vertebrates
In: Beidler, L.M. (ed): Handbook of Sensory Physiology
Vol. IV, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
(1971) pp 27-58
- 40) Graziadei, P.P.C.:
Cell dynamics in the olfactory mucosa
Tissue Cell 5, 113-131 (1973)
- 41) Graziadei, P.P.C.:
The ultrastructure of vertebrates olfactory mucosa
In: Friedmann, I. (ed): The ultrastructure of sensory
organs, North Holland Publishing Company, Amsterdam-
London (1973) pp 269-305
- 42) Graziadei, P.P.C., Bannister, L.H.:
Some observations on the fine structure of the
olfactory epithelium in the domestic duck
Z. Zellforsch. 80, 220-236 (1967)
- 43) Graziadei, P.P.C., DeHan, R.S.:
Neuronal regeneration in frog olfactory system
J. Cell Biol. 59, 525-530 (1973)
- 44) Graziadei, P.P.C., Karlan, M.S., Monti Graziadei, G.A.,
Bernstein, J.J.:
Neurogenesis of sensory neurons in the primate olfac-
tory system after section of the fila olfactoria
Brain Res. 186, 289-300 (1980)
- 45) Graziadei, P.P.C., Levine, R.R., Monti Graziadei, G.A.:
Plasticity of connections of the olfactory sensory
neuron: regeneration into the forebrain following
bulbectomy in the neonatal mouse
Neuroscience 4, 713-727 (1979)
- 46) Graziadei, P.P.C., Metcalf, J.F.:
Autoradiographic and ultrastructural observations on
the frog's olfactory mucosa
Z. Zellforsch. 116, 305-318 (1971)
- 47) Graziadei, P.P.C., Monti Graziadei, G.A.:
Continuous nerve cell renewal in the olfactory system
In: Jacobson, M. (ed): Handbook of Sensory Physiology
Vol. IX, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
(1978) pp 55-83

- 48) Graziadei, P.P.C., Monti Graziadei, G.A.:
The olfactory system: a model for the study of
neurogenesis and axon regeneration in mammals
In: Cotman, C.W. (ed): Neuronal Plasticity, Raven
Press, New York (1978) pp 131-153
- 49) Graziadei, P.P.C., Monti Graziadei, G.A.:
Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory
system of mammals
I. Morphological aspects of differentiation and
structural organization of the olfactory sensory
neurons
J. Neurocytol. 8, 1-18 (1979)
- 50) Graziadei, P.P.C., Monti Graziadei, G.A.:
Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory
system of mammals
III. Deafferentiation and reinnervation of the
olfactory bulb following section of the fila olfactoria
in rat
J. Neurocytol. 9, 145-162 (1980)
- 51) Graziadei, P.P.C., Monti Graziadei, G.A.:
Plasticity of connections in the olfactory sensory
pathway: transplantation studies
In: Van der Starre, H. (ed): Olfaction and Taste VII,
IRL Press, London-Washington DC (1980) pp 155-158
- 52) Graziadei, P.P.C., Okano, M.:
Neuronal degeneration and regeneration in the olfactory
epithelium of pigeon following transection of the first
cranial nerve
Acta Anat. 104, 220-236 (1979)
- 53) Heimoto, H., Takahashi, Y., Koshikawa, T., Nagura, H.,
Kato, K.:
Immunohistochemical localisation of Gammaenolase in
normal human tissues other than nervous and
neuroendocrine tissues
Lab. Invest. 52, 257-263 (1985)
- 54) Harding, J.W., Donlan, K., Chen, N., Wright, J.W.:
Behavioral and biochemical support of olfactory neuron
replacement
Neurosci. Abstr. 3, 230-237 (1977)
- 55) Harding, J., Margolis, F.L.:
Denervation in the primary olfactory pathway of mice
III. Effect on enzymes of carnosine metabolism
Brain Res. 110, 351-360 (1976)
- 56) Harding, J., Graziadei, P.P.C., Monti Graziadei, G.A.,
Margolis, F.L.:
Denervation in the primary olfactory pathway of mice
IV. Biochemical and morphological evidence for neuronal
replacement following nerve section
Brain Res. 132, 11-28 (1977)

- 57) Harding, J.W., Wright, J.W.:
Effects of intranasal irrigation with mitotic inhibitors on olfactory behaviour and biochemistry in mice
Brain Res. 168, 31-41 (1979)
- 58) Hartman, B.K., Margolis, F.L.:
Immunofluorescence localisation of the olfactory marker protein
Brain Res. 96, 176-180 (1975)
- 59) Hassoun, J., Gambarelli, D., Grisoli, A., Henric, A., Toga, M.:
Esthesioneuroepithelioma, a true neurosensorial tumor light- and electron-microscopic study of a case with endocranial extension
Acta Neuropathol. 55, 77-80 (1981)
- 60) Herrold, K.M.:
Induction of tumors in the Syrian hamster with diethylnitrosamine (N-Nitrosamine)
Cancer Res. 23, 773-777 (1963)
- 61) Herrold, K.M.:
Induction of olfactory neuroepithelial tumors in Syrian hamsters by diethylnitrosamine
Cancer 17, 114-121 (1964)
- 62) Hirano, T., Aida, T., Moriyama, M., Asano, G., Susuki, I., Yuge, K.:
Primary neuroblastoma of the nasal cavity and review of literature
Acta Pathol. Jpn. 35, 183-191 (1985)
- 63) Hyden, H., Mc Ewen, B.:
Glial protein specific for the nervous system
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 55, 354-358 (1966)
- 64) Jafek, B.W.:
Ultrastructure of human nasal mucosa
Laryngoscope 93, 1576-1599 (1983)
- 65) Jessen, K.R., Mirsky, R.:
Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein
Nature 286, 736-737 (1980)
- 66) Kahn, L.B.:
Esthesioneuroblastoma: A light and electron microscopic study
Human Pathol. 5, 364-371 (1974)
- 67) Kauer, J.S.:
Olfactory receptor cell staining using horseradish peroxidase
Anat. Rec. 200, 331-336 (1981)

- 68) Keller, A., Margolis, F.L.:
Immunological studies of the rat olfactory marker protein
J. Neurochem. 24, 1101-1106 (1975)
- 69) Kreem, R.M., Margolis, F.L.:
Olfactory marker protein: Turnover and transport in normal and regenerating neurons
J. Neurosci. 4, 868-879 (1984)
- 70) Lidow, M.S., Menco, B.Ph.M.:
Observations on axonemes and membranes of olfactory and respiratory cilia in frogs and rats using tannic acid-supplemented fixation and photography rotation
J. Ultrastruct. Res. 86, 18-30 (1984)
- 71) Loo, S.K.:
Fine structure of the olfactory epithelium in some primates
J. Anat. 123, 135-145 (1977)
- 72) Loupal, G., Mikula, M.:
Olfaktorius-Neuroblastom bei einem Pferd
Pferdeheilkunde 1, 65-69 (1985)
- 73) Ludwin, S.K., Kosek, J.C., Eng, L.F.:
The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labeled antibodies
J. Comp. Neurol. 165, 197-208 (1976)
- 74) Mackay-Sim, A., Patel, U.:
Regional differences in cell density and cell genesis in the olfactory epithelium of the salamander, *Ambystoma tigrinum*
Exp. Brain Res. 57, 99-106 (1984)
- 75) Mair, R.G., Gesteland, R.C., Blank, D.L.:
Changes in morphology and physiology of olfactory receptor cilia during development
Neuroscience 2, 3091-3103 (1982)
- 76) Margolis, F.L.:
A brain protein unique to the olfactory bulb
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1221-1224 (1972)
- 77) Margolis, F.L.:
Carnosine in the primary olfactory pathway
Science 184, 909-911 (1974)
- 78) Margolis, F.L.:
A marker protein for the olfactory chemoreceptor neuron
In: Proteins of the nervous system, Bradshaw, R.A., Schneider, D.M. (ed)
Raven Press; New York (1980)

- 79) Margolis, F.L.:
Olfactory marker protein (OMP)
Scand. J. Immunol. 15, Suppl. 9, 181-199 (1982)
- 80) Margolis, F.L., Roberts, N., Ferriereo, D., Feldman, J.:
Denervation in the primary olfactory pathway of mice: biochemical and morphological effects
Brain Res. 81, 469-483 (1974)
- 81) Margolis, F.L., Tarnoff, J.:
Site of biosynthesis of the mouse brain olfactory bulb protein
J. Biol. Chem. 248, 451-455 (1973)
- 82) Matulionis, D.H.:
Light and electron microscopic study of the effects of $ZnSO_4$ on mouse nasal respiratory epithelium and subsequent responses
Anat. Rec. 183, 63-81 (1975)
- 83) Matulionis, D.H.:
Ultrastructural study of mouse olfactory epithelium following destruction by $ZnSO_4$ and its subsequent regeneration
Am. J. Anat. 142, 67-90 (1975)
- 84) Matulionis, D.H.:
Light and electron microscopic study of the degeneration and early regeneration of olfactory epithelium in the mouse
J. Anat. 145, 79-100 (1976)
- 85) Matulionis, D.H., Breipohl, W., Bhatnagar, K.P.:
Degeneration and regeneration of olfactory epithelium in the mouse
Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl. 89, 1-12 (1982)
- 86) Mc Gavran, M.H.:
Neurogenous nasal neoplasms
Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 79, 547-550 (1970)
- 87) Menco, B.Ph.M.:
Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and nasal respiratory structures of frog, ox, rat, and dog I. A general survey
Cell Tissue Res. 207, 183-209 (1980)
- 88) Menco, B.Ph.M.:
Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and nasal respiratory epithelial surfaces of frog, ox, rat, and dog III. Tight-Junctions
Cell Tissue Res. 211, 361-373 (1980)
- 89) Menco, B.Ph.M.:
The ultrastructure of olfactory and nasal respiratory epithelium surfaces. In: Nasal tumors in animals and man, Reznik, G., Stinson, S.F.(ed)
CRC Press, Boca Raton (1983)

- 90) Menco, B.Ph.M.:
Ciliated and microvillous structures of rat olfactory and nasal respiratory epithelia. A study using ultra-rapid cryo-fixation followed by freeze-substitution or freeze-etching
Cell Tissue Res. 235, 225-241 (1984)
- 91) Mennel, H.D., Wechsler, W., Zülch, K.J.:
Morphologie und Morphogenese der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Nasenhöhliertumoren beim Goldhamster
Beitr. Path. 151, 134-156 (1974)
- 92) Mills, S.E., Frierson, H.F.:
Olfactory neuroblastoma - a clinicopathologic study of 21 cases
Amer. J. Surg. Pathol. 9, 317-327 (1985)
- 93) Miragall, F., Mendoza, A.S., Breipohl, W.:
Intercellular junctions of the main and vomeronasal olfactory sensory epithelia in rodents. A freeze-fracture study
Verl. Anat. Ges. 77, 745-746 (1983)
- 94) Miragall, F., Monti Graziadei, G.A.:
Experimental studies on the olfactory marker protein II. Appearance of the olfactory marker protein during differentiation of the olfactory sensory neurons of mouse: an immunohistochemical and autoradiographic study
Brain Res. 239, 245-250 (1982)
- 95) Monti Graziadei, G.A.:
Experimental studies on the olfactory marker protein III. The olfactory marker protein in the olfactory neuroepithelium lacking connections with the forebrain
Brain Res. 262, 303-308 (1983)
- 96) Monti Graziadei, G.A., Graziadei, P.P.C.:
Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy
J. Neurocytol. 8, 197-213 (1979)
- 97) Monti Graziadei, G.A.:
Studies on neuronal plasticity and regeneration in the olfactory system: Morphologic and functional characteristics of the olfactory sensory neuron In: Neural growth and differentiation, Meisami, E., Brazier, M.A.B.(ed)
Raven Press, New York (1979)
- 98) Monti Graziadei, F.L., Margolis, J.W., Harding, P.P.C., Graziadei, P.P.C.:
Immunocytochemistry of the olfactory marker protein
J. Histochem. Cytochem. 25, 1311-1316 (1977)

- 99) Monti Graziadei, G.A., Stanley, R.S., Graziadei, P.P.C.:
The olfactory marker protein in the olfactory system of
the mouse during development
Neuroscience 5, 1239-1252 (1980)
- 100) Moore, B.W.:
A soluble protein characteristic of the nervous system
Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 739-744 (1965)
- 101) Moore, B.W.:
Chemistry and biology of two proteins, S-100 and 14-3-
2, specific to the nervous system
Int. Rev. Neurobiol. 15, 215-223 (1972)
- 102) Moore, B.W.:
Chemistry and biology of the S-100 protein
Scand. J. Immunol. 15, Suppl. 9, 53-74 (1982)
- 103) Moran, D.T., Rowley, J.C., Jafek, B.W.:
Electron microscopy of human olfactory epithelium
reveals a new cell type: A microvillar cell
Brain Res. 253, 39-46 (1982)
- 104) Moran, D.T., Rowley, J.C., Jafek, B.W., Lovell, M.A.:
The fine structure of the olfactory mucosa in man
J. Neurocytol. 11, 721-746 (1982)
- 105) Moulton, D.G.:
Dynamics of cell populations in the olfactory
epithelium
Ann. N. Y. Acad. Sci. 237, 52-61 (1974)
- 106) Moulton, D.G.:
Cell renewal in the olfactory epithelium of the mouse
In: *Olfaction and taste V*, Denton, D.A., Coghlan, J.P.
(ed)
Academic Press; New York, San Francisco, London (1975)
- 107) Moulton, D.G., Fink, R.P.:
Cell proliferation and migration in the olfactory
epithelium In: *Olfaction and taste IV*, Schneider,
D. (ed)
Wiss. Verlags-Gesellschaft, Stuttgart (1972)
- 108) Nagahara, Y.:
Experimentelle Studien über die histologischen
Veränderungen des Geruchsorgans nach der
Olfaktionsdurchschneidung. Beiträge zur Kenntnis des
feineren Baus des Geruchsorgans
Japan. J. Med. Sci. Sect. S Pathol. 5, 165-199 (1940)
- 109) Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E.:
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Bd IV
Nervensystem - Sinnesorgane - Endokrine Drüsen
Parey, Berlin, Hamburg (1975)

- 110] Obermann, H.A., Rice, D.H.:
Olfactory neuroblastomas: A clinicopathologic study
Cancer 838, 2494-2502 (1976)
- 111] Okano, M., Weber, A.F., Frommes, S.P.:
Electron microscopic studies of the distal border of
the canine olfactory epithelium
J. Ultrastruc. Res. 17, 487-502 (1967)
- 112] Oley, N., Detlan, R.S., Tucker, D., Smith, J.C.,
Graziadei, P.P.C.:
Recovery of structure and function following
transection of the primary olfactory nerves in pigeons
J. Comp. Physiol. Psychol. 88, 477-495 (1975)
- 113] Osamura, R.Y., Fine, G.:
Ultrastructure of the esthesioneuroblastoma
Cancer 38, 173-179 (1976)
- 114] Pospischil, A., Dahme, E.:
Neuroepitheliale (ästhesioneurogene) Tumoren der
Riechschleimhaut bei der Katze. Eine licht- und
elektronenmikroskopische Untersuchung
Zbl. Vet. Med. A 28, 214-225 (1981)
- 115] Rafols, J.A., Getchell, T.V.:
Morphological relations between the receptor neurons,
sustentacular cells and Schwann cells in the olfactory
mucosa of the salamander
Anat. Rec. 206, 87-101 (1983)
- 116] Reese, T.S.:
Olfactory cilia in the frog
J. Cell Biol. 25, 209-230 (1965)
- 117] Rehn, B., Breipohle, W., Schmidt, C., Schmidt, U.,
Effenberger, F.:
Chemical blockade of olfactory perception by N-methyl-
formimino-methylester in albino mice II. Light
microscopical investigations
Chem. Senses 6, 317-328 (1981)
- 118] Samanen, D.W., Forbes, W.B.:
Replication and differentiation of olfactory receptor
neurons following axotomy in the adult hamster: a
morphometric analysis of postnatal neurogenesis
J. Comp. Neurol. 225, 201-211 (1984)
- 119] Schachner, M., Hedley-White, E.T., Hsu, D.W.,
Schoonmaker, G., Bignami, A.:
Ultrastructural localisation of glial fibrillary acidic
protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase
labeling
J. Cell Biol. 75, 67-73 (1977)

- 120) Schmechel, D.E.:
 Gamma subunit of the glycolytic enzyme Enolase:
 Nonspecific or neuron specific
 Lab. Invest. 52, 239-242 (1985)
- 121) Schmechel, D., Marangos, P.J., Brightman, M.:
 Neuron-specific enolase is a molecular marker for
 peripheral and central neuroendocrine cells
 Nature 276, 834-846 (1979)
- 122) Schmechel, D., Marangos, P.J., Zis, A.P., Brightman, M.,
 Goodwin, F.K.:
 Brain enolases as specific markers of neuronal and
 glial cells
 Science 199, 313-315 (1978)
- 123) Schochet, S.S.Jr., Peters, B., O'Neal, J., Mc Cormick,
 W.F.:
 Intracranial esthesioneuroblastoma. A light and
 electron microscopic study
 Acta Neuropathol. 31, 181-189 (1975)
- 124) Schultz, E.W.:
 Regeneration of olfactory cells
 Proc. Soc. exp. Biol. 46, 41-43 (1941)
- 125) Shah, J.P., Feghali, J.:
 Esthesioneuroblastoma
 Am. J. Surg. 142, 456-458 (1981)
- 126) Shanmugaratnam, K.:
 Histological typing of upper respiratory tract tumors
 Intern. Histol. Classific. of Tumours Nr. 19, WHO-
 Geneva (1978)
- 127) Simmons, P.A., Getchell, T.V.:
 Neurogenesis in olfactory epithelium: loss and recovery
 of transepithelial voltage transients following
 olfactory nerve section
 J. Neurophysiol. 45, 516-528 (1981)
- 128) Simmons, P.A., Getchell, T.V.:
 Physiological activity of newly differentiated
 olfactory receptor neurons - correlated with
 morphological recovery from olfactory nerve section in
 the salamander
 J. Neurophysiol. 45, 529-549 (1981)
- 129) Simmons, P.A., Rafols, J.A., Getchell, T.V.:
 Ultrastructural changes in olfactory receptor neurons
 following olfactory nerve section
 J. Comp. Neurol. 197, 237-257 (1981)
- 130) Smith, C.G.:
 Changes in the olfactory mucosa and the olfactory
 nerves following intranasal treatment with one percent
 Zinc sulfate
 Canad. Med. J. 39, 138-140 (1938)

- 131) Smith, C.G.:
Regeneration of sensory olfactory epithelium and nerves
in adult frogs
Anat. Rec. 109, 661-671 (1951)
- 132) Spallize, G., Mennel, H.D., Martin, G.:
Histogenesis of olfactory neuroblastoma I. Electron
microscopy of typical human case
Path. Res. Pract. 180, 516-520 (1985)
- 133) Sternberger, L.A.:
Immunocytochemistry
John Wiley&Sons; New York, Chichester, Brisbane,
Toronto (1979)
- 134) Takagi, S.F., Yajima, T.:
Electric responses to odors of degenerating olfactory
epithelium
Nature (lond.) 202, 1220-1226 (1964)
- 135) Takashaki, K., Isobe, T., Ohtsuki, Y., Akagi, T., Sonobe,
H., Okuyama, T.:
Immunohistochemical study on the distribution of a and
b subunits of S-100 protein in human neoplasms and
normal tissues
Virchows Arch. B 45, 385-396 (1984)
- 136) Takahashi, S., Iwanaga, T., Takahashi, Y., Nakano, Y.,
Fujita, T.:
Neuron-specific enolase, neurofilament protein, and S-
100 protein in the olfactory mucosa of human fetuses.
An immunohistochemical study
Cell Tissue Res. 236, 231-234 (1984)
- 137) Takagi, S.F., Yajima, T.:
Electric activity and histological changes in the
degenerating olfactory epithelium
J. Gen. Physiol. 48, 559-569 (1965)
- 138) Taxy, J.B., Hidvegi, D.F.:
Olfactory neuroblastoma: an ultrastructural study
Cancer 39, 131-138 (1977)
- 139) Thomas, C.:
Durch Nitrosamine experimentell erzeugte Nasenhöhlen-
tumoren bei der Ratte
Verh. Dtsch. Ges. Path. 49, 245-248 (1965)
- 140) Thomas, C.:
Zur Morphologie der Nasenhöhle-tumoren bei der Ratte
Z. Krebsforsch. 67, 1-10 (1965)
- 141) Trojanowski, J.Q., Lee, V., Pillsbury, N., Lee, S.:
Neuronal origin of human esthesioneuroblastoma
demonstrated with anti-neurofilament monoclonal
antibodies
N. Engl. J. Med. 307, 159-161 (1982)

- 142) Tucker, D., Graziadei, P.P.C., Smith, J.C.:
Recovery of olfactory function in pigeons after
bilateral transection of the olfactory nerves In:
Olfaction and taste V, Denton, D.A., Coghlan, J.P.(ed)
Academic Press; New York, San Francisco, London (1975)
- 143) Van der Stricht, O.:
Le neuro-epithelium olfactif et sa membrane limitante
interne
Mem. Acad. Roy. Med. de Belgique 20, 45-50 (1909)
- 144) Vinores, S.A., Bonnin, J.M., Rubinstein, L.J., Merangos,
P.J.:
Immunohistochemical demonstration of neuron-specific
enolase in neoplasms of the CNS and other tissues
Arch. Pathol. Lab. Med. 108, 536-540 (1984)
- 145) Yen, S.H., Fields, K.L.:
Antibodies of neurofilament, glial filament, and
fibroblast intermediate filament proteins bind to
different cell types of the nervous system
J. Cell Biol. 88, 115-126 (1981)

Herrn Prof. Dr. E. Dohme gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Dissertationsthemes, die Betreuung der Arbeit und die jederzeit gewährte Unterstützung.

Frl. Kallweit, Frl. Martin, Frl. Hebel, Frl. Hofmann, Frau Siebert und besonders Herrn Tauscher danke ich für die Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Herrn Reifenberg und Herrn Martin für ihre wertvolle Hilfe bedanken.

Lebenslauf

11. August 1960	geboren in München Eltern: Hans und Brigitte Hafner, geb. Fröhlich
1966-1970	Besuch der Grundschule in München
1970-1979	Besuch des Louise-Schröder-Gymnasiums in München
1979-1984	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Februar 1985	Approbation als Tierarzt
seit	
November 1986	Vollbeschäftigte wissenschaftliche Hilfs- kraft am Institut für Tierpathologie, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie

